

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-508881

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)10月5日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	类别記号	序内整理番号	F I
C 12 P 21/02	ZNA C	9282-4B	
C 12 N 1/19		8828-4B	
9/90		9152-4B	
15/09			
	9281-4B	C 12 N 15/00	A
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平6-501587
(36) (22)出願日	平成6年(1994)6月2日
(36)翻訳文提出日	平成6年(1994)12月12日
(36)国際出願番号	PCT/US93/05318
(37)国際公開番号	WO93/25676
(37)国際公開日	平成5年(1993)12月23日
(31)優先権主張番号	901,713
(32)優先日	1992年6月12日
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	マルク エンド カンパニー インコーポレーテッド アメリカ合衆国、ニュージャージィ 07065、ローウエイ、イースト リンカーン アヴェニュー 126
(71)出願人	ユニバーシティー・オブ・ケント・アット・カンタベリー イギリス国、ケント・シー・テイン・2・7・エヌ・ゼット、カンタベリー、ザ・レジストリー(登録なし)
(74)代理人	弁護士 川口 輵道 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名稱】 サッカロミセスセレビシアエによるジルフィド結合をもつ組換えタンパク質の発生を増加させる方法

(57)【要約】

酵母によって産生されるジルフィド結合をもつ組換えタンパク質、特に組換え分泌タンパク質の収率を増加させる方法を開示する。タンパク質ジルフィドイソメラーゼ(PDI)酵素は分泌及び細胞表面タンパク質におけるジルフィド結合の形成を触媒する。ここでは、ヒトPDI又は酵母PDIを調節的に過剰产生する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の組換え株の構築を開示する。これらの株は、治療面で潜在的に重要なジルフィド結合をもつタンパク質を極めて多量に分泌する。これらの株は、ジルフィド結合をもつ種々のタンパク質の產生を増加させる可能性を有する。

請求の範囲

1. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、
  - (a) 組換え宿主内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを発現させるステップ、及び
  - (b) 前記組換え宿主内で、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を発現させるステップ
 を含むことを特徴とする前記方法。
2. ステップ(a)でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え遺伝子が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素をコードする組換え発現カセットのコピーを一つ以上含む請求項1に記載の方法。
3. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが宿主細胞ゲノムに組込まれる請求項2に記載の方法。
4. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが目的的複数のプラスミド上に含まれている請求項3に記載の方法。

5. 一組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が、一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項1に記載の方法。
6. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組込まれる請求項1に記載の方法。
7. ステップ(a)のジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組込まれる請求項1に記載の方法。
8. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項5に記載の方法。
9. ステップ(a)の組換え蛋白が哺乳動物である請求項1に記載の方法。
10. ステップ(a)の組換え蛋白が酵母である請求項1に記載の方法。

11. 酵母が Saccharomyces cerevisiae または Cryptococcus albidus の種の酵母である請求項10に記載の方法。
12. 酵母が Saccharomyces cerevisiae の種である請求項11に記載の方法。
13. 酵母が Saccharomyces cerevisiae である請求項12に記載の方法。
14. ステップ(b)の組換え遺伝子がアンチスクランである請求項1に記載の方法。
15. ステップ(b)の組換え遺伝子がマダニ前綫血タンパク質である請求項1に記載の方法。
16. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項1に記載の方法。
17. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項1に記載の方法。
18. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがセトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項17に記載の方法。

19. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、
  - (a) 組換え酵母宿主細胞内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを産生するステップ、及び
  - (b) 前記組換え宿主内で、分離ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を発現させるステップ
 を含むことを特徴とする前記方法。
20. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項19に記載の方法。
21. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項19に記載の方法。
22. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項21に記載の方法。
23. ステップ(a)でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え酵母宿主が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする組換え発現カセットのコ

特表平7-508881 (8)

ビーカー一つ以上含む請求項19に記載の方法。

24. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが酵母細胞内膜ゲノムに組込まれる請求項23に記載の方法。

25. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが自律的複合プラスミド上に含まれている請求項23に記載の方法。

26. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつタンパク質をコードする組換え遺伝子が一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項18に記載の方法。

27. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項19に記載の方法。

28. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え酵母細胞を3.0%以下の濃度で増殖する請求項19に記載の方法。

29. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え酵母細胞を約2.0%～2.5%の濃度で

増殖する請求項28に記載の方法。

30. ジスルフィド結合をもつタンパク質がアンチスタンダードである請求項23に記載の方法。

31. ジスルフィド結合をもつタンパク質がマグニチ酸山タンパク質である請求項23に記載の方法。

32. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを產生する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 9-6 の株。

33. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の酵母株。

34. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の酵母株。

#### 明細書

サッカロミセスセレビシアエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の産生を増加させる方法

#### 発明の背景

タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、分泌タンパク質及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の修復に関わる酵素である。脊椎動物 PDI の保存された (conserved) 「チオレドキシン様」活性部位を検出するように設計されたオリゴアミノ酸ド (WCGHCK) (配列番号: 1) を用いて、本発明者は下芽真核生物 *Saccharomyces cerevisiae* から PDI をコードする遺伝子を単離した。クローニングした遺伝子のスクレオチド配列及び推定残存アミノ酸は、分子量 59,082 及び pI = 4.1 の 530 アミノ酸からなるタンパク質を示すが、これらは哺乳動物 PDI の物理的性質である。また、アミノ酸配列は哺乳動物及び鳥類の PDI 配列に対しても 30%～32% の同一性と 53%～56% の相似性とを示し、全体的構造が極めて類似しており、特に、各々が反復性である三つの 100 残基セグメ

ントが存在する。哺乳動物及び鳥類の PDI に対する最も大きな相違は、保存された「チオレドキシン様」活性部位を含む領域 (a, b, c) にある。日本地図では該部位は調査可能な分歧シグナル配列の特徴を有しており、C 末端の 4 個のアミノ酸 (-HDEL) (配列番号: 2) は、該タンパク質が *S. cerevisiae* 小胞体 (ER, R.) の成分であるということと合致している。この遺伝子 (PDI 1-1 と称する) の複数のコピー各有する多量體複合体は 1.0 倍の SDS-PAGE レベルを有し、平均された分子量のタンパク質を過剰表現する。PDI 1-1 遺伝子は酵母ゲノム内で非反復性であり、定期期細胞には存在せず、また転写導入できない單一の 1.8 kb DNA をコードする。PDI 1-1 遺伝子の表現はハプロ型死性 (haploid-lethal) であり、これ半数遺伝子の産物が生存能力 (viability) にとって必須のものであることを意味する。

チオール：ジスルフィド交換反応を触媒する酵素であるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、分泌細胞の ER 内腔 (lumen) の主な常在タンパク質成分である。酵母の粗抽出液、細胞下の位置及び発現程度に随して立派な单一の蛋白質は、該酵母が分泌タンパ

## 精表平7-508881 (4)

ク質の生成である他の役割を果たすことを示唆しており (Freedman, 1984, Trends Biochem. Sci., 9, pp. 438-441)。これはその場での *in situ* 遷移的架橋結合の研究によって裏付けられている (Rothberg & Pierce, 1987, Biochemistry, 26, pp. 4179-82)。PDI を欠失しているミクロソーム類が同時にタンパク質形成の特異的次元を示すという発見は (Bullard & Freedman, 1988, Nature, 336, pp. 649-51)、該酵素が分別及び細胞液固タンパク質の生成成の間に天然ジスルフィド結合形成の触媒として機能することを意味する。この役割は、該酵素のラカルボン酸の触媒活性について知られている事実、即ち該酵素がチオール：ジスルフィド交換反応を触媒して正味のタンパク質ジスルフィドの形成、硫化又は異性化を生産させ、且つ多數にわたる選元され且つ折り畳みのないタンパク質基質においてタンパク質の折り畳み及び本邦のジスルフィド結合の形成を担うことができるという事実と一緒にしている (Freedman ら, 1989, Biochim. Biophys. Acta, 951, pp. 591-601) のうち、PDI は明確に機能された

触媒活性を有するという点で希有である。

PDI は哺乳動物の粗縫から容易に単離され、均質酵素は特徴的な酸性 pI (4.0~4.5) を有するホモダイマー (homodimer) ( $2 \times 57\text{ kD}$ ) である (Edmann ら, 1984, Méthode Enzymol., 107, pp. 281-292)。該酵素はコムギ及び蕎麥 *Chlamydomonas reinhardtii* からも精製された (Kasai ら, 1990, Biochem. J., 268, pp. 63-68)。活性は底物面の起因で検出されており、予測報告では、PDI 活性は *S. cerevisiae* において検出可能であると断言された (Westergaard ら, 1988, FEBS Letters, 212, pp. 133-135)。最近になって、クローンングした cDNA 配列に及んで由来する多くの PDI の完全アミノ酸配列が報告された。その中には、マウス由来 (Edmann, 1988, Nature, 332, pp. 267-270)、ラクシ由来 (Yamamoto ら, 1987, Biochem. Biophys. Res. Comm., 140, pp. 1485-1492)、ヒト由来 (Pribljejan-Lemire, 1987, EMBO J., 6, pp. 643-6)、隣接由来 (Stockergaard, B. ら, 前出引用文献; Farquhar ら, 前出別月文獻) 及びヒヨコ由来 (Parkkonen ら, 1988, Biochem. J., 254, pp. 1005-1011) の PDI がある。これらの脊椎動物類に由来するタンパク質全体を通して高度の配列保存を示し、いずれも、最初にマウス PDI 配列で観察された数つかの結合的特徴を示す (Edmann, 1988, 前出別月文獻)。最も興味なものは、互いに密接に接觸しており且つオレドキシン、即ち構造 Cys<sup>1</sup> 残基の間に形成された活性部位ジスルフィドノチオール結合を含む小さいレドックス活性タンパク質に密接に関連した配列を有する残基数約 100 の二つの領域が PDI 配列中に存在することである。オレドキシンでは活性部位配列が ECGPCK (配列番号: 3) であり、PDI 中に二つ存在する対応する側鎖は配列 ECGNCK (配列番号: 1) を有する (PDI 配列中で同定された他の反復領域、セーフ及び指向性について後で説明する)。

PDI に対応するか又は密接に関連した配列は、ジスルフィド結合の形成以外の機能の分析を目的とする研究で開

## 特表平7-508881 (5)

述べられた。例えば、PDTIが、S, R, 内の新生 (new synthesis) すなわち新合成 (new synthesis) プロテオラーゲンポリペプチドの主な翻訳後修飾を検査する粗抗体 (粗抗体プロトリル-4-ヒドロキシラーゼのβサブユニットとして作用するという事実が立証されている (Pichlejan et al., 1987, J. Biol. Chem., 262, pp. 6447-649)。また、PDTIが同種粗抗体のN-アセチル化のシステムに関与することを示唆する事実もあり (Gebethen-Habib et al., 1988, Cell, 54, pp. 63-68)、最近では、該抗体が、トリグリセリドを新生分泌リボタンパク質に交換する複合体に関与しているという説も出ている (Watterson, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9800-7)。このように、PDTIは分泌タンパク質の間接修飾及び翻訳後修飾で複数の機能を果たし得る (Freedman, 1989, Cell, 57, pp. 1069-72)。

哺乳動物分泌タンパク質の大半は、複数の分子内及び／又は分子間ジスルフィド結合を有している。非固定的構

造例としては、下垂体ホルモン、インターロイキン、免疫グロブリン、プロテアーゼ及びその阻害物質、並びに他の血清タンパク質が挙げられる。この他のタンパク質は機械的進歩学の主要課題の一つであるが、細胞及び臓器内でこれらタンパク質の発現における初期の体験では、これらのタンパク質を直接的に活性な組換え酵物として得る上で多くの問題があることが強調された。その結果、一般的には細胞培養、特ににはタンパク質の折り畳み及びジスルフィド結合形成をより深く解明する必要が蓄積されるようになつた。

单一の折り畳みドメインを有するジスルフィド結合をもつタンパク質は通常、正確にジスルフィド結合した状態を実質的な収率で形成するためには、完全に還元、酸性化してミルクセミオドで再生することができる。このプロセスでは、ゆっくり異性化して天然のジスルフィド結合を生成する多くの複数にジスルフィド結合した形態の組合集団が迅速に形成される。該プロセスは、チオール／ジスルフィド酸化還元酵素 (例えば GSH 及び GSSG) 及びアルカリ性蛋白によって触媒される。比較及び機械ジスルフィド形成を防止するためには、タンパク質濃度を低くする必

要がある。通常は、天然タンパク質の生成速度及び実験可能な収率はどちらも、分子内ジスルフィド数の増加に伴って低下する。この問題は、各ドメインが折り畳まれてそれぞれの天然ジスルフィド結合を独立して形成しなければならない複数のジスルフィド結合ドメインを含むタンパク質 (例えば組成プラスミノーゲン活性化因子) ではより重大である。

In vivo のジスルフィド結合形成プロセスは、翻訳と同時に、又は極めて早期の翻訳後修飾として生起する。哺乳動物細胞の S, R, 内腔の類似及び新生成分のタンパク質の研究では、天然ジスルフィド結合が既に形成されていることが判明している。In vivo のプロセスは、分泌細胞内に豊富に存在するタンパク質であり小胞体の内腔面 (luminal face) に局在する酵素、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼによって触媒されると思われる (Freedman, R. B., 1984, Trends in Biochemical Sciences, 9, 438-441)。この酵素は In vitro で、広範囲のタンパク質複合体においてチオール：タンパク質＝ジスルフィド交換反応を触媒し、天然タンパク質ジスルフィ

ド形成の細胞生物学に必要とされる特性を有する (Free-  
dman, R. B., 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, 939-942)。該酵素の役割を明らかにする別の事実としては、(i) 该酵素の粗膜分布がジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成速度のそれと合致するという事実 (Brockway, B. E., 1980, Biochem. J., 191, 873-876)、及び (ii) 多くの系で、存在する酵素の量が、ジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成速度の生理学的変化に平行して変化するという事実 (Brockway, B. E., 1980, Biochem. J., 191, 873-876; Freedman, R. B., 1983, "Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological & Toxicological & Clinical Aspects", A. Larsson, S. Ogrenius, A. Holmgren & B. Mannerheim, Raven Press, New York, pp. 271-282; Paver, J. L., 1989, FEBS Letters, 242, pp. 857-

## 特表平7-508881 (6)

382) が挙げられる。

該酵素の発現は、多くの動物類 [Lamblert et al., N.及び Freedman, R. B., 1983, Biochem. J., 213, pp. 225-234] 及びコムギ [de Azevedo, G. M. V. G., 1983, Biochem. Soc. Trans., 12, 1043] で明らかにされ、分子構造及び動力學的特性の類似性保存が観察された [Freedman, R. B. et al., 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, pp. 939-942; Brockway, B. B. 及び Freedman, R. B., 1984, Biochem. J., 219, 51-59]。しかしながら、該酵素は、高等真核生物又は細菌においてはまだ十分に研究されていない。少なくとも一部の酵母分離タンパク質（例えばキラー酵素）はジスルフィド結合を含んでいるため、酵母と高等真核生物との間の、分離に関するメカニズム及び分子成分の調査の複雑性は、該酵素又は酵似体が酵母内に存在することを強く示唆させる。

商業的に重要な哺乳動物タンパク質の発現のための万能酵素（versatile host）としての酵母の選

用は、酵母分離の限定された能力、及び酵素能力と高等真核生物のそれとの相違（例えばブリコシン化における相違）によって、ある程度の困難を強むられる。

本発明は、酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する組換え宿主細胞内でジスルフィド結合タンパク質を固定するための新規の方法と、クンバク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する組換え酵母細胞とを提供する。本発明は、ジスルフィド結合をもつ組換え酵母タンパク質の分離を実質的に且つ子細胞に増殖させる組換え酵母宿主細胞を提供する。

### 発明の要旨

ヒト及び酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（PDI）をコードするDNAを用意し、プロモーターと転写因子とポーターとを含む表現カセット又はベクターにクローニングする。PDIをコードするDNAを含む表現カセット又はベクターを宿主細胞内にトランスポーすると、該細胞はPDIタンパク質を過剰発生する。これらのPDI過剰発生細胞を、ジスルフィド結合をもつタンパク質の興味のための組換え宿主として使用する。ジスルフィド結合をもつタンパク質の分離は、PDI過剰発生細胞では、

通常レベルのPDIを産生する宿主細胞と比べて実質的に増加する。

### 図面の簡単な説明

第1図は、マルチコピープラスミド上に酵母PDIをコードする遺伝子を有するS. cerevisiae形質転換体の無細胞液解液のSDS-PAGE分析を示している。

第2図は、「COMPARE」及び「DOT PLOT」ソフトウェア（UWCGC）を用いた酵母PDIとラットPDIとの間のドットプロットアライメント（dot plot alignment）を示している。哺乳動物PDIのアミン酸連鎖は同じ縮尺で酵母アミン酸連鎖の下に示されている。

第3図は、酵母PDI上遺伝子の数値に関するストラテジー及び結果を示している。パネル（a）は、PDI1-HES3遺傳子に対して異型複合体のHes1\* AS23 24番の四分子（tetramer）分析の結果を示す。

第4図はプラスミドpUC-GAL10-pの構造を示している。

第5図はプラスミドpUC-GAL10-p-hPDIの構造を示している。

第6図は、pUC18-GAL10-p(S)ADH1の

としても知られているプラスミドp491の構造を示している。

第7図はプラスミドpUC18-GAL10-p-yPDI-E-ADH1の構造を示している。

第8図は、K991としても知られているプラスミドpKH422/ATSの構造を示している。

第9図はYEp24-GAL10-p-yPDIの構造を示している。

第10図はYEp24-GAL10-p-MFa-hPDIの構造を示している。

第11図はpUC-GAL10-yPDI/ATSの構造を示している。

第12図はpUC-GAL10-yPDI/ATSの構造を示している。

### 発明の詳細な説明

酵母におけるタンパク質の折り畳み及び分離のプロセスは複雑であり、遺伝子研究に基づいて看れば、30以上の遺伝子産物が開発している（Franzusoff, I. L. A. S., 1981, Methods Enzymology, 194, p. 662-674）。これらの生物とし

特許平7-508881 (7)

及び／又はジスルフィド結合形成の促進に関連していると見られる現象である。

本発明は、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)をコードするDNAを過剰発現させることにより、酵母及真核細胞による組換えタンパク質の産生を増加させる方法を提供する。本明細書中のPDIとは、分子内及び分子間ジスルフィド結合の形成を特異的に触媒する酵素を意味する。

幾つかの種に由来するPDI遺伝子のDNA配列は当業界で知られている。これらの種の多段階的具体例としてはヒト、ウシ、ラット、ニワトリ及び豚等が挙げられる。

(Mizunaga S., 1990, J. Biotechnol., 108, pp. 846-851; Scheerens, 1991, Yeast, 7, pp. 185-193)。

PDIをコードするDNAの導入における効果的組合元素の種類の細胞又は組織であってよく、非酵母的真核細胞としては、哺乳動物及び他の脊椎動物の細胞及び組織、並びに下等真核生物の細胞及び組織が挙げられる。ここでは本発明を、組換え酵母若手細胞内で実現される酵素及びヒトPDIを用いて説明する。当業者には容易に理解されるよ

うに、本発明では別の著者同士、別元は未記載の具体例として哺乳動物細胞、植物細胞、細菌のような原核生物の細胞、昆虫細胞、並びに酵母及び糸状菌類のようない下等真核生物の細胞を使用する。また、これも当業者には明らか未だよう、酵母及びヒト細胞以外の細胞に由来するPDIをコードするDNAの使用も本発明の範囲内に包含される。PDIをコードするDNAの別の種類の非限定的具体例としては、ヒト以外の脊椎動物、例えばラット及びマウス、非脊椎動物、例えば昆蟲、並びに下等真核生物、例えば藻類が挙げられる。

Rothblat G. L. 及び Meyer J. の方法(1986, Cell, 44, pp. 619-628)の方法でS. cerevisiaeから培養したミクロソーム諸フラクションは低レベルのタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)活性を有していたが、該レベルは著者処理によって8~20倍増加した。これは、脊椎動物の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI(Mitton et al., 1983, Biocchem. J., 212, pp. 245-8)・Lambert及び Freedman, 1985, Biocchem., J., 228, pp. 635-45)及びコムギ

の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI(Rothblat et al., 1982, FEBS Lett., 128, pp. 123-4)と類似の酵素が、該酵素の小胞体の内側に存在することを示唆するものであった。高等真核生物酵素に対して相間の、PDIをコードする遺伝子をクローニングした。高度の保守を示す可能性が最も高い領域は、脊椎動物PDIにおいて高度に保存されており、特に二つの重複性ジオール活性部位の領域でオレドキシンに対して極めて高い相間を示す<sup>a</sup>及び<sup>b</sup>ドメインであると思われる。活性部位の共通部分はPYA<sup>a</sup>PWC<sup>b</sup>GHC<sup>a</sup> (配列番号:4)である (Parkkonen et al., 1988, 前出引用文献)。赤道元性39マーオリゴスクレオチドを酵母コードンバイアス(bias)に基づいて設計し (Shatz et al., 1986, Nucleic Acids Res., 14, pp. 5125-43)、これを実験検証して、マルチコピーYEpプラスミドpMA3と内で構築した酵母ゲノムライブラリーのスクリーニングを使用した (Crouzet及びTullis, 1987, Mol. Gen. Genet., 210, pp. 381-3)。スクリーンから二つの中でも相性のクローン(C7及びC10と称する)が回

## 特許平7-508881 (B)

収され、予清剖離地図を作成した結果、導入体サイズはそれを1.4 kb及び1.4, 5 kbであり、二つの導入体は共通の制限部位をいくつか有することが判明した。クローンC7の導入物を更に分析した。

クローンC7が確かにPDIをコードすることを確認するため、酵母*S. cerevisiae*のMD40/4cde1/trp1 ura2 his3 leu2-Tu (Fiersら, 1986, E. M. B. O., J., 1, pp. 603-608) をクローン7及び質粒プラスミドpMA3で形質転換した。S1カット-PAGE分析の結果、C7の質転換体は、主要5.8 kDaボリペプチドを過剰発現し、おそらくは約7.2 kDaの第二のボリペプチドも過剰発現することが判明した(第1図)。また、二つの株の最初地図解説はPDI活性についてアッセイしたこと、C7の質転換体は10倍のPDI活性レベル(3.8, 6×10<sup>-11</sup> U/μgタンパク質)を示した。これら二つの事実は、活性部位配列HCCGPK(配列番号:8)を有する*S. cerevisiae*オタリドキシンは分子量が約1.2 kDaであるため(Porrasら, 1970, J. Biol. Chem., 245, pp. 2363-70)、C7クロ

ーンがPDIをコードし、オタリドキシンをコードしないという見方を裏付けるものであった。

既述上のPDIコーディング配列の位置を決定する(locate)ために、C7クローンを種々の制限酵素で消化し、消化断片をニトロセルロースにトランスファーし、前述の80マー「活性部位」オタリドキシンオナドープローブした。この操作では、5 kbのBamHI-EcoRIフラグメントと、それぞれ5, 14及び4, 5 kbの二つの明らかな横断しているHindIII-HindIIIフラグメントとが同定された。後者のパターンは、活性部位のコピーを二つ含むDNAについて予測されるであろうように、「活性部位」プローブの標的が二つ存在し得ることを示唆するものであった。二つのHindIII-HindIII部位からの予想のDNA配列分析では、脊椎動物PDIに対して弱い相同意を示す繰り返し(ORF)の存在が明らかにされたが、これらは遺伝配列ではないため、他にもHindIII-HindIII部位が存在するに違いないことも判明した。この推測は、詳細な制限地図の作成とDNA配列決定によって確証された。天孫の制限部位とオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、二つの横断HindIII-HindIII部位を含む2, 6 kbのHindIII

HindIII-HindIIIフラグメントの配列決定を専門の機会を行った。

DNA配列は、予測された分子量5.8, 0.82の、530アミノ酸を含むボリペプチドをコードすることができる1593 bpの单一鎖取り替の存在を予測させた(Fiersら, 1986, R., 1, 前出引用文献, 第2回参照)。鎖取り替には、密度に多いタンパク質をコードする酵母mRNAに典型的なコドンバイアスを有していた(Bennetzen及びHall, 1982, J. Biol. Chem., 257, pp. 3029-3031)。コドンバイアス指数(Codon Bias Index)の計算値は0.80であった。

決定されたヌクレオチド配列の分析は、多様な標準的酵母プロモーター及びターミネーターをチーフを明らかにした(Fiersら, 1986, R., 1, 前出引用文献, 第2回参照)。これらのセクターは、鎖取り替に対しても-10と-35との間に位置する(TATA), 配列の一部分としてのTATA-TATAボックス接着部位と、位置-201と-23等との間のピリミジンに富んだ領域(3'ヌクレオチドのうちの3-4)を含む。鎖取り替の3'末端には、TATA

翻訳ターミネーターに続いて、*S. cerevisiae*内での転写終点及び/又はポリアデニル化のシグナルを仮定される配列(Zaret及びSherman, 1982, Cell, 28, pp. 568-732)、並びに真核生物ポリアデニル化部位(Proudfoot及びBrown, 1976, Nature, 264, pp. 211-4)の両方に對する相図が存在する。

該クローン化遺伝子が転写されたかどうかを調べるために、鎖取り替に対して内側の800 bp HindIII-HindIIIフラグメントを用いて、二つの異なる染色法、グルコース及びアラートで、異なる増殖サイクル技術まで増殖させた*S. cerevisiae*の二つの異なる株(MD40/4c及びSK82n [α/a ade1/+ade2/+his3Δ1/+] Gascione, 1979, J. Biol. Chem., 254, pp. 8865-3960])から調製した全mRNA断片のノーザンプロットをプローブした。酵母増殖細胞では、グルコース及びアラート培養細胞で第一の1, 8 kbの断片が検出されたが、非増殖細胞では断片は殆ど検出できなかった。断片のサイズは、mRNAの5'及び3'領域内の非標記配列の

約200スクレオチドを考慮に入れて、被取り扱により平均された通りであった。

予測されたアミノ酸配列は、下記の理由によって該配列が正にPDIであることを強く示唆した：

(1) 予測された59kDaの分子量と、哺乳動物PDIに特徴的なpI(4.1)とを有していた；

(2) 該アミノ酸配列は、BESTFIT™ソフトウェア(GWCGG, University of Wisconsin)によって決定されたように、先に報告された哺乳動物及び鳥類のPDI在列に対して、9.0～9.2%の全体的同一性と、5.8～5.6%の全体的類似性とを示した；

(3) 该アミノ酸配列中の位置58～65及び403～410は「チオレドキシン様」活性部位の二つのコピー名古屋でいた。また、これらの配列は、哺乳動物PDI内の重複'a/a'領域に対して高度のアミノ酸同一性を示す割合(0.0アミノ酸のより大きい内部重複(Internal dupl. sequence))の一割分であった(第2図)。酵母及び哺乳動物PDI配列を並べると(Cattington et al.)、a及び'a'領域の外側に、大きな相間を示す所の像模が存在することも明らかになった(第2図)。

また、コードされたボリペプチドの前の二つの特異は、これがS. cerevisiae小胞体の成分であることを示唆している。該タンパク質は、推定上の分離シグナルの特徴を有する著しく疎水性のN-末端配列をコードし(Gierasch, 1989, Biochemistry, 28, pp. 923-930)、四つのC末端アミノ酸は酵母SIPのそれと同じであり(Normington & Hall, 1989, Cell, 57, pp. 1223-36)。S. cerevisiaeの小胞体保持シグナルであると報告されている(Pelham, 1988, EMBO J., 7, pp. 1757-62)。

本発明者は、クローン化S. cerevisiaePDI遺伝子をPDI1と名づけた。このS. cerevisiaePDI1遺伝子はゲノム内のただ一つのコピーに存在する。これは、酵母のG, 8kb HindIII-SmaIフラグメントを種々のゲノム消化物に対するプローブとして用いる高灵敏ハイブリダイゼーションにより確認された。

株一のPDI1遺伝子が生存能力にとって必須であるかどうかを調べるために、HIS3遺伝子(Montiel,

G. F. G., 19814, Nucleic Acids Res., 12, pp. 1049-1068)を有する1.8kbのSamH IフラグメントがPDI1コーティング配列内のEcoRV部位に挿入されている(第3図)。ヌル(null)対立遺伝子を構築した。his3二倍体酵母は、sacrecerevisiae株(A33324; [Spal] dining, A., 1988, Ph. D. Thesis, University of Kent)を、pdi1+HIS3挿換を有するDNAフラグメントで形質転換して、PDI1遺伝子の二つの染色体コピーのうち一つを最初非機能性対立遺伝子で置換した。三つのHIS3A3324形質転換体(Y1, Y2及びY3)を更に構成した。いずれの場合も、二倍体の孢子形成率断子当たり二つの生存可能孢子を産生しただけであり(第3図)、これらは能動的であった。この結果は、致死型遺伝子pdi1+HIS3対立突然変異に隣接していないことを示すものである。正確な遺伝子座がHIS3形質転換体Y1及びY2において生じたことは、8.0% pのpdi1+HIS3フラグメントをプローブとして用いる、pdi1+HIS3対立したプロットされた酵母ゲノムDNAへのサインハ

イブリダイゼーションにより確認された。PDI1遺伝子は内部PstI部位を含まないが(第3図)、HIS3遺伝子は單一ApaI部位を含むため(第3図)、これまで記述したHIS3対立遺伝子は標準に固定される筈である。予測されたように、非形質転換株A33324では單一の9.8kb pdi1フラグメントが検出されたが、Y1及びY2形質転換体では9.8kb及び2.2kbという二つのバンドが、由来の異なる二つのバンドからなると指摘される9.8kbバンドと共に検出された。これらのデータは、二つの染色体のうち一方の染色体上のPDI1遺伝子がHIS3対立遺伝子で置換され、このような寡数がハプロ致死であることを立証するものである。

酵母PDIをコードするDNAsを分子的にクローニングするためには、種々の方法のうち任意のものを選択して用いる。これらの方法の非確定的具体例としては、適当な発現ベクター系内でのPDI含有DNAsライブラリーの構築に次ぐ、PDI遺伝子の直接的機能発現が挙げられる。別の方針は、バクテリオファージ又はプラスミドセクトルベクター内で構築したPDI含有DNAsライブラリーを、PDIタンパク質のアミノ酸配列から設計した標識付オリゴヌクレオ

### 特許平7-508881 (10)

イブタリーエクサマスは、例えばManiatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982) に記載されている。

PDTをコードするDNAを適当なゲノムDNAライプラリーから単離し得ることも當業者には明らかであろう。

ゲノムDNAライプラリーの構築は當業者に良く知られている標準的方法で実現できる。良く知られているゲノムDNAライプラリー構築方法は、Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982) に記載されている。

前述の方法で得たクローニングPDTは、組換えPDTを產生するために、適当なプロモーターと別の適当な転写調

チドブロープマスクリーニングすることからなる。好ましい方法は、プラスミドシャトルベクター内で複数したヒト又は酵母等の1合子ゲノムDNAライプラリーを、酵母細胞内での既知のアミノ酸配列をコードする指定PDTアプロードマスクリーニングすることからなる。

當業者には容易に理解されるように、別タイプのライプラリー、及び別の細胞又は組織タイプから構築したライプラリーもPDTをコードするDNAの単離に有用である。別のタイプのライプラリーの実験的具体例としては、酵母細胞以外の別ヒト、脊椎動物及び下等真核生物細胞又は細胞系に由来するcDNA及びゲノムDNAライプラリーが挙げられる。

當業者には明らかかのように、適当なライプラリーは、PDT活性を有する細胞又は細胞系から調製し得る。PDT-cDNAを単離するためのcDNAライプラリーの形成で使用するための細胞又は細胞系の選択体、前述の方法を用いて、最初に細胞結合PDT活性を測定することにより実施し得る。

cDNAライプラリーの形成は當業者に良く知られている標準的方法で実施できる。良く知られているcDNAラ

筋エレメントとを含む発現ベクターへの分子クローニングにより組換え的に始祖し、原核生物又は真核生物宿主細胞内にトランسفァーし得る。この種の操作を行うための技術は、特にManiatis, T., らの文献に詳述されており、當業者には良く知られている。

本明細書では、発現ベクターは、遺伝子のクローン化コピーの被写と、mRNAの適適な宿主内での翻訳を必要とするDNA配列であると定義される。この種のベクターは、細菌、酵母、植物細胞、藻類、昆虫細胞又は動物細胞のようないくつかの宿主内で真核生物遺伝子を発現させるのに使用し得る。

特異的に設計したベクターは、適空間、例えば細菌-酵母又は細菌-動物細胞のDNAのシナトリングを可能にする。選択に供給した発現ベクターは、宿主細胞内の自動的複製のための複製起点と、選択可能なマークーと、固定数の有用な制限酵素部位と、高コピーナ数へのポテンシャルと、活性プロモーターとを含んでいる必要がある。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させRNA合成を開始させるDNA配列であると定義される。強力なプロモーターは、mRNAが高頻度でインシニエートされる

ようにするプロモーターである。発現ベクターの実験的具体例としては、クローニングベクター、導入されたクローニングベクター、特異的に設計されたプラスミド又はウイルスが挙げられる。

哺乳動物細胞内で組換えPDTを発現させるためには、種々の哺乳動物発現ベクターを使用し得る。組換えPDT発現に適し得る市販の哺乳動物発現ベクターの非特異的具体例としては、pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG6 (Stratagene), EBV-pSV2-neo (ATCC 37593), pBRFV-1 (8-2) (ATCC 37110), pDBPY-MMTneo (842-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37198), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCP2-g (ATCC 37460) 及び pZD35 (ATCC 37565) が挙げられる。

PDTをコードするDNAはまた、種々の細胞又は宿主細胞内での発現のために発現ベクターにクローニングし得る。組換え者細胞は原核生物、例えば非限定的具体例として

## 附表平7-508881 (11)

K-1、ADH1、ADH2、PHO5及びGAP491  
(TDH3)を利用し得る。また、組換え相手内でのR1A  
の表現をアッセイするため、過剰なアッセイシステム、  
例えばイムノプロット又はR1Aもしくはエンザイムイム  
ノアッセイ(EIA)を使用し得ることも産業者には競  
かであらう。

5. C. enterobacterは、抗病原性としてのガ  
ラクトースの作用に関与している酵素をコードする遺伝子  
を五つ有している。GAL1、GAL2、GAL5、GAL7及びGAL10はそれぞれ、ガラクトキナーゼ、ガラ  
クトースペルメアーゼ、ホスチゲルコムターゼの遺伝子  
ソブライム、ローダーガラクトース-1-オクシフェトウリ  
ジルトランスクエラーゼ及びウラシングホスホガラクトー<sup>5</sup>  
ース-4-エピメラーゼをコードする。ガラクトースが存在  
しないと、これらの酵素の発現はほとんど検出されない。  
細胞をグルコースで培養し、次いでガラクトースを培養液  
に加えると、これら5種類の酵素はRNA転写のレベルで、  
少なくとも1、000倍だけ(GAL5は例外であって、  
時折培養される)瞬時に増殖される。GAL1、GAL2、GAL5、GAL7及びGAL10遺伝子を分子

的にクローニングし配列決定した。それぞれのコーディン  
グ領域の5'側の調節及びプロモーター配列は、S. cerevisiae  
遺伝子のコーディング領域に接続して配置した。これらの  
実験で、ガラクトースの供給に必要十分なプロモーター及  
び導入配列が決定された。

5. C. enterobacterはまた、各々がADH酵  
素のアミノ酸配列をコードする三つの遺伝子を有する。これらの酵  
素のうちの一つであるADH1は、S. cerevisiaeと  
同様に酸化物増殖時にエタノールを成長源として利用す  
る能力に関与している。ADH1のアイソブライムをコード  
するADH2遺伝子の発現はグルコースにより異化代謝酵  
素抑制されるため、0.1% (w/v) のレベルのグルコ  
ースの存在下では典型的増殖のMATα遺伝子の発現は  
実質的に行われない。グルコースが消失しており且つ非動  
植物成長源が存在すると、ADH2遺伝子の発現は100~  
1000倍増幅される。この遺伝子を分子的にクローニン  
グして配列決定し、既存の抑制解除 (alpha-rennin resis  
tance) に必要十分な導入及びプロモーター配列を決定し  
た。

アルファ接合因子 (alpha-mating fac-

tor) は、MATα細胞とMATα細胞との間の接合に  
必要とされる且、C. enterobacter細胞のモンである。  
このトリテカベプチドは、組換え細胞内に送られ、グ  
リコシル化され、タンパク質分解的にプロセシングされて、  
細胞から分泌される最終成熟形態となるプレプロフェロモン  
として発見される。この生化学的経路は、外來オリベブ  
チドの発現ストラクチャーとして利用されてきた。アルファ  
接合因子遺伝子は分子的にクローニングされ、プレプロリ  
ード配列を有する該遺伝子のプロモーターは種々のポリ  
ペプチドの発現及び分泌に利用されてきた。また、PHO5  
遺伝子プロモーターは低濃度ホスフェートによって誘導  
し得ることが判明した。これは、酵母内での外來タンパク  
質の生理学的に調節された発現にとっても有用である。

アルファ接合因子プロモーターは、表現型的に並である  
細胞内でのみ活性を示す。S. cerevisiaeには  
SIRとして知られている四つの遺伝子座があり、これら  
は $\alpha$ 及び $\alpha$ 情報を運ぶサイレントの別のコピーの抑制に必  
要なタンパク質を合成する。この抑制事象を妨害する温度  
感受性 (ts) 基因が、これらの遺伝子座のうち少なくとも  
一つの座の遺伝子座内に存在する。この突然変異体で

は、35度での着壙が抑制を起こし、その結果、アルファ複合因子プロモーターが不活性である表現型的に $\beta$ -D-ガラクト糖が生じる。温度を23度にシフトすると、細胞は表現型的に $\beta$ -D-ガラクト糖を産生する。したがってPDI酵素を有する株の使用は、後述の外挿ボリベブチドの利説された発現について説明されてきた。

当業者には容易に理解されるように、PDIの発現のための適当な酵母株は広範囲の模様の中から選択される。適当な酵母株の非限定的具体例としては、ブロテアーチ又は未改変化したグリコシル化能力をもつたような遺伝子型の及び表現型的特徴を有するものが挙げられる。

Saccharomyces属は様々な種からなる。S. cerevisiaeは現在の外挿ボリベブチドの組換えDNA仲介発現のための宿主として最も一般的に使用されている。しかしながら、Saccharomyces属の他の種の間の区別は必ずしも明確ではない。これらの種の多くはS. cerevisiaeと交換することができる。S. cerevisiaeのプロモーターと類似の又は同じプロモーターを有していると思われる。結って、当業者には容易に理解されるように、PDI発現のための酵母株

の適切範囲は、Saccharomyces属の別の種、例えば非限定的具体例としてCandida、Diastaticus、Longisporus、Kluyveri、Montanus、Norbensisまた、Avelloromilis、rouxii及びuvarumにまで広がる。

幾つかの酵母属、例えばCandida、Hansenula、Pichia及びTorulopsisは、唯一の増殖用酵素源としてのメタノールの利用について酵母の代謝経路を有することが判明した。この代謝経路に関する酵素であるアルコールオキシダーゼの遺伝子はPichia pastorisから単離されている。又、P. pastorisアルコールオキシダーゼプロモーターは單離されて、発現のメタノール誘導に敏感であることが判明した。このような酵素可能プロモーターは、酵母内でのボリベブチド発現に有用である。特に、このプロモーターは、P. pastoris内での異種遺伝子の効率可能な発現用のプラットフォームとして優秀であることが判明した。この結果は、別の酵母属が活性型のボリベブチドの組換えDNA仲介発現のための宿主として機能する可能性を強調するものである。

次に、当業者には容易に理解されるように、PDI発現のための宿主の選択範囲は、Saccharomyces cerevisiae科及びCryptococcaceae科の別の酵母属の種、例えば非限定的具体例としてCandida、Hansenula、Kluyveromyces、Pichia、Saccharomyces cerevisiae科のTorulopsisにまで広がる。

発現ベクターは、多くの方法、例えば非限定的具体例として形質転換、トランスクレプション、プロトプラスト融合法及び電気穿孔法のうち任意の方法を用いて宿主細胞内に導入し得る。発現ベクター含有細胞はクローン的に増殖し、種々に分離して、PDIタンパク質を産生するかどうかを調べる。PDI発現宿主細胞クローンの同定は、幾つかの方法、例えば非限定的具体例として既PDI抗体に対する免疫学的反応性、及ぼす宿主細胞蛋白PDI活性の存在によって実施し得る。

PDI-DNAの発現はまた、*in vitro*で產生した合成mRNAを用いて実施し得る。合成mRNAは酵母の無相溶システム、例えば非限定的具体例としてコムギ胚芽抽出物及び大鼠赤血球抽出物中で効率的に翻訳でき

と共に、細胞ベースのシステム、例えば非限定的具体例としてカエル卵母細胞内へのマイクロインジェクションで効率的に翻訳できる。

当業者には容易に理解されるように、PDIは、細胞当たり单一のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノムに組込まれた組換え発現力セットに由来する組換え遺伝子で発現され得る。また、これも当業者には明らかであろうが、PDIは、細胞当たり单一のコピー又は複数のコピーで自律的複製プラスミド上に存在する組換え発現力セットに由来する組換え遺伝子内で発現され得る。

組換えPDIを発現する組換え酵母細胞は、別の組換え遺伝子の発現のための宿主として使用し得る。本発明の新規の方法は、組換えPDIを発現する宿主細胞内で、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAを発現させることにより、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の収率を実質的に増加させる。当業者には容易に理解されるように、本発明の方法ではジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質が産生され得る。ジスルフィド結合をもつタンパク質の非限定的具体例としては、分離される又は初期結合状態を保持するタンパク質が挙げられる。

ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の発明のための組換えDNA技術者は、PDTについて詳述した方針によって形成し得る。當業者には明らかかなようは、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、相應当なり同一のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノムに組込まれた組換え表現カセットから発現され得る。また、これも當業者には明らかであらうが、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞当たり單一のコピー又は複数のコピーで、因縁的複製プラスマド上に存在する組換え表現カセットから発現され得る。異に、これも當業者には容易に理解される事であるが、PDTをコードするDNA及びジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、相應當たり同一のコピー又は複数のコピーで、同一プラスマド上に存在し得る。ジスルフィド結合をもつ二つ以上のタンパク質が、組込まれたカセットもしくはプラスマド上のカセット、又はこれらの組合せから同時に発現され得ることも當業者には明らかである。

組換え宿主細胞内でのPDTの発現後は、PDTタンパク質を回収して、タンパク質中のジスルフィド結合の形成

を触媒することができる活性型の精製PDTを製造し得る。PDT精製方法は幾つか存在し、使用に適している。突然起算に由來するPDTの精製について触説したように、粗換えPDTは細胞溶解液及び抽出物、又はならし培養液である。塩分画、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排離クロマトグラフィー、ヒドロキシルアバタイト吸着クロマトグラフィー及び群集的相互作用クロマトグラフィーを既々に用ひわせて又は併々に利用して精製し得る。

更に、有機溶PDTは、PDTに特異的なモノクローナル又はポリクローナル抗体を用いて形成したイムノアフィニティカラムを用いて、別の細胞タンパク質から分離することができる。

PDTに対する單一特異性抗体を、PDTに対して反応性を示す抗体を含む培養動物抗血清から精製するか、又はKohler及びMilstein, *Nature* 259: 496-497 (1975)に記載の方法を用いて、PDTに対して反応性を示すモノクローナル抗体として製造する。本明細書中の單一特異性抗体は、PDTに対する均一結合特性を有する單一の抗体種又は複数の抗体種であると定義される。本明細書中の均一結合 (homogeneous)

(one binding) という用語は、抗体種が特徴の抗体又はエピトープ、例えば前述のようなPDTと結合する能力を指す。非特異的抗体は、マウス、ラット、モルモット、ウナギ、ヤギ、ウマ等の動物、好ましくはウサギを、免疫アジュバントを用いて又は用ひないで、通常な用量のPDTで免疫感作することにより產生する。

最初の免疫操作の前に免疫前血清を回収する。静脈じ得る免疫アジュバントと組合せたPDTを約1.1ml～1.000mlまで各動物に投与する。静脈じ得る免疫アジュバントの非常常的異体例としては、フロインドの完全アジュバント、タマインドの不完全アジュバント、ミョウバン抗体物、*Corynebacterium parvum* 及びmRNAを含む油和水エマルジョンが挙げられる。最初の免疫操作は、好ましくはフロインドの完全アジュバント中の酵素を、皮下 (SC) 、腹腔内 (IP) 又はその両方で複数の部位に接觸することからなる。各動物から一定の時間間隔、好ましくは一週間隔で採血して、抗体力値を測定する。動物には、最初の免疫操作後は、ブースター注射をしてもしなくてもよい。ブースター注射をした動物には、通常、同量のフロインド完全アジュバント中酵素を同

一経路で与える。ブースター注射は、最大力値が得られるまで約1週間の期間で行う。各ブースター感作から約1日後、又は单一免疫感作の後で約1週間に動物から採血し、過剰を回収し、アリコートを約-20°Cで貯蔵する。

雌交尾マウス、好ましくは約1.6ml/cをPDTで免疫感作して、PDTと反応するモノクローナル抗体 (mAb) を製造する。マウスは、前述のように、I.P又はS.C. 程度で、少量の静脈じ得るアジュバントに混入した約0.5mlの緩衝液又は生理食塩水約0.1ml～約1.0ml、好ましくは約1mlのPDTで免疫感作する。好ましくはフロインドの完全アジュバントを使用する。マウスは1日に最初の免疫操作を施し、約3～約30週間にわたりて休息させる。免疫感作したマウスには、リン酸缓冲液食塩水のような緩衝液中約0.1～約1.0mlのPDTの供与からなる一回以上のブースター免疫操作を、静脈注射 (IV) によって施す。放尿陽性マウスに由来するリンパ液、好ましくは脾臓リンパ液を、當業者に公知の標準的方法で免疫マウスから臍膜を除去することによって得る。臍膜リンパ液と過剰な臍膜相争、好ましくは臍膜腫瘍細胞と、安定なハイブリドーマを形成させる条件下で融合して、

## 特表平7-508881 (14)

ハイブリドーマ細胞を製造する。融合指掌の非限定的具体例としては、マウス骨髓腫P 3 / NS 1 / A g 4 - 1 ; MPC - 1 E ; S - 1 B 4 及び S 9 2 / 0 が挙げられるが、ほとんどののは S 9 2 / 0 である。抗体産生細胞及び骨髄腫細胞を、約 8.0 % ~ 約 5.0 % の濃度で、約 1.000 m o l . ml<sup>-1</sup> のポリエチレンジゴルダル中で融合させる。当業者は公知の方法で、ヒホキサンチン、チミジン及びアミノブテリンを添加したタルベッコ改良イーグル培地 (D M E M) での増殖により、融合したハイブリドーマ細胞を選択する。約 1.0 × 1.0 及び 2.0 比例に増殖性細胞から上清液を回収し、P D I を抗原として用いる固相イムノラジオアッセイ (S P I R A) のようなイムノアッセイによってスクリーニングし、抗体の選出を調べる。m o l / l のアイソタイプを調べるために、培養液を Ouchterlony 法及びアッセイでも検査する。抗体陽性ウェルからのハイブリドーマ細胞を、MacPherson の数量測定技術 (G o f t Agar Techniques, Tissue Culture Methods and Applications, Kruse 及び Petersen 著, Academic Press, 1973) によりクローン

する。

初回抗原刺激 (� 1 月 10 日) から約 4 日後、ブリスケン液体 B e l b / ヨウ素に、マウス血清約 0.5 ml にて、約 2 × 1.0 × 約 6 × 3 ml<sup>3</sup> のハイブリドーマ細胞を注入することにより、モノクローナル抗体を約 1.0 ml で発生する。細胞のトランスクターから約 8 ~ 12 日後に廻水を回収し、当業者に公知の方法でモノクローナル抗体を精製する。

約 2 % のウシ胎児血清を含む D M E M 中でハイブリドーマを増殖させて *In vitro* の約 10 倍生を行い、十分な量の特異的 mAb を得る。該 mAb を当業者に公知の方法で精製する。

廻水又はハイブリドーマ培養液の抗体成分を、種々の血清的又は免疫学的アッセイ、例えば非限定的具体例として、沈降法、反応凝集、E L I S A (Enzyme-linked Immunosorbent assay) 及びラジオイムノアッセイ (R I A) で測定する。細胞のアッセイを用いて、体液又は組織及び細胞由物中の P D I の存在を検出する。

当業者には容易に理解されるように、單一特異性抗体を

製造するための前述の方法は、P D I ポリペプチドフラグメント又は完全長さの P D I ポリペプチドに特異的な抗体の產生に使用し得る。

抗体がアガロースゲルベース支持体との共有結合を形成するように N - H 2 キシスクシングルヒドロキセルで予備活性化したゲル支持体である A f t i l g a i - 1 0 (B i o r a d ) に抗体を加えて、P D I 抗体アフィニティカラムを形成する。抗体は、スペーサーアームとのアミド結合を介してゲルに結合する。次いで、残りの活性化ムステルを 1 M ユクノールアミン H C I (p H 8) でターンシグする。カラムを水及び 0.2 M グリシン H C I (p H 2.6) で順次洗浄して、非結合抗体又は外来タンパク質を除去する。次いでカラムをリン酸緩衝液洗浄食塩水 (p H 7.2) 中で平衡化し、P D I を含む細胞培養液又は細胞抽出物をゆっくりとカラムに通す。該カラムをリン酸緩衝液洗浄水で光学密度 (A<sub>260</sub>) がバックグラウンドに低下するまで洗浄し、次いでタンパク質を 0.2 M グリシン H C I (p H 2.6) で洗浄する。次いで、精製 P D I タンパク質をリン酸緩衝液洗浄水に対して透析する。

以下の実施例は本発明を実現するためのものであって、その範囲を限定するものではない。

### 実施例 1

#### 株及び増殖条件

*Saccharomyces cerevisiae* 株  
MD 40 / 4 C (M A T α, L e u 2 - 3 - 1 1 2, U r a 3, H i s 3 - 1 1, - 1 6, L e u 1) 及び A S 9 3  
2 4 (M A T α / M A T " a " H i s 3 / H i s 3, L e u 2 / L e u 2, U r a 3 / U r a 3, L e u 1 / L e u 1) で、Y E P D (1 % バクトペプトン、1 % 酵母抽出液、2 % グルコース) 又は p H 6.8, 8 段階最少培地 (0.67 % アミノ酸無含有酵母塗ベース、2 % グルコース、1 % ヨハク酸、0.6 % NaO H, 5.0 mg / ml メリオノシトール) に必要な培基及びアミノ酸を加えたものにて 30 ℃ で増殖させた。

*S. cerevisiae* 保育 R Y 3 8 8 (M A T α,  
S u t 3 - 8, L e u 2 - 1 1 2, A r o 1, U r a 3 -  
5 2, H i s 4; Brake, A. J., S., 1984, P.  
roc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A., 81,

### 特表平7-508881 (15)

P.P. 4842-4846) 及び B.I. 1996 (MAT<sub>a</sub>, Leu2, arg1, ura3-5G, prt1-1, l2, pep4-3, gal2; Jones, E. W., 1991, *Methods Enzymol.*, 194, p. 428-458) を P.D. I. 選別部位の基準に使用し、適切な実施例に記載のように操作させた。

大腸菌 (Escherichia coli) 種 DH5<sub>a</sub> (supE 44ΔlacU 169 <φ 80lacZΔM 15> hsdR 17, recA1, endA2, gyrA 96, thi1-1, relA1) をプラスミドスクレーニング操作に使用した。

### 実施例 2

#### DNA操作

制限マーカーを消化及びDNAを凍結後、酵素製造業者 (B C L, B R M) の指示に従って実施した。E. coli 上形質転換の標準的プロトコル (Cohenら, 1972, P. N. A. S. U.S.A., 69, p. 3110-3112 及び S. cerevisiae 形質転換の標準的プロトコル (Beaggs, 1978, *Nature*, 275, p. 6,

6, 前出引用文献) を用いた。

非組込みスクレオチドから導かオリゴスクレオチドを分離すべく DE-52 クロマトグラフィーを使用して、前記ライブラーをスクリーニングするためには、前記オリゴスクレオチド 50 ng を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP [Amersham, 3 0 0 0 Ci/mmol], 1 及び 24ボリスクレオチドキヤーゼで末端標識した。次のようなクロニーハイブリダイゼーションにより、約 20, 000 DH5<sub>a</sub> 細胞をコロニーをニトロセルロースフィルターでスクリーニングした：各ニトロセルロースフィルターを、55mM ルツブリ、6×SSC、1×デンhardt 液液、250 μg/ml 単性サケ雄子 DNA、0.1% SDS 中で、37℃で 1 時間にわたり予備ハイブリダイズした。導かオリゴスクレオチド (比活性 4, 8 × 10<sup>9</sup> dpm/μg) を 0℃で 3 分間挿入し、次いで予備ハイブリダイゼーション液糊液中で 2 ml/g/m<sup>2</sup> に敷設し、フィルターに加えた。37℃で更に 1.6 時間インキュベートした後、フィルターを除出し、4×SSC、0.1% SDS 中で 2 分間洗いだ。該フィルターを一晩オートラジオグラフィーにかけた。

39 個の潜在的陽性コロニーが同定され、これらを前述

104-9 (Itoh, 1983, *J. Bacteriol.* 158, p. 163-8) を実施した。Holm らの方法 (1986, *Cane*, 42, p. 168-73) で S. cerevisiae からゲノム DNA を製造した。

### 実施例 3

#### P.D. I. 選択子の作成

高コピーレベル (2-4, 2ミクロンベースペクター) M13<sub>a</sub> (Crouzet 及び Toite, 1987, 同上引用文献) の BamH I 部位にクローニングした S. cerevisiae 種 SKQ 2 α [α/s ade1/α ade2/α his1/s1/+; Gal1::ura4] (前出引用文献) に由来する DNA の部分的 S. d u 3& フラグメントを含む群母ゲノムライブラーを、P.D. I. 選択子についてのスクリーニングに使用した。3' マーカリゴスクレオチド (5'-CTTACACTGACCACAGCATGGCGCTAGat3') (配列番号: 6) を、高純度で保存されている「チオレドキシン核」部位 (PYAPWCGHCK) (配列番号: 4) に対して、色付群母コードバイアスを用いて (Shibata ら, 198

6, 前出引用文献) を用いた。

のスクリーニングに更に 2 回かけると、その後で 10 倍の陽性クローニ (標識付き C 1 ~ C 10) が得られた。これらのクローンのうちの二つ (C 7 及び C 10) の制限地図を作成し、クローン C 7 を後続の研究のために選択した。

### 実施例 4

#### DNA配列の解析

配列決定に導いた大きさのフラグメントを同定するためには、クローン C 7 を一連の制限酵素で消化し、3' 端アガロースゲル上でフラグメントを分離し、真庭プロッティング装置 (Nihonbioid Ltd.) を用いて *Genesensor* sen-P プロトランプラン (DuPont) にトランスファーした。次いで、Maniatis らの方法 (1982, 前出引用文献) に実質的に従ってフィルターを予備ハイブリダイゼーションし、その後、前述のようは末端標識し蒸発した 3' マーカリゴスクレオチドプローブを加えた。ハイブリダイゼーションを 6×SSC 中 4.3℃ で 24 時間実施し、次いで 2 回の洗浄を 2.0 ml の 2×SSC 中で 1 分間行い、更に 2 回の洗浄を 2.0 ml の 2×SSC、0.1% SDS 中で 0.5 分で 1 時間行い、最後に 5.0 ml の 0.

### 特表平7-508881 (16)

1×SSC中で室温で1回洗浄した。次いでフィルターを-70°Cで45時間オートラジオグラフィーにかけた。

グデオキシ核ターミネーター法 (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463-5471) を用いて、クローンC7に由来する2,4kbのβ-珠蛋白フラグメントを完全に配列決定した。配列決定に適した網膜フライメントを、Holmes及びQuigleyの迅速な方法 (1981, Anal. Biochem., pp. 193-197) を用いて配列決定前に製造したプラスミドDNAとpUC19と共にサブクローニングした。更に、幾つかのフラグメントを一本鎖ベクターmp12又はmp18にクローニングした (Messing, 1983, Methods Enzymol., 101, pp. 20-78)。一連の配列決定プライマー (15-18mer) を合成した。これらのプライマーは、クローニングベクターのポリリンカーゲン、又は予め確定した内部C7-DNA配列にアンピリングする。プライマーのアンピリングに先立ち、プラスミドDNAを0.2M NaOH、2mM EDTA中で37°Cで30分間変性し、0.1%の3M酢酸ナトリウム

MD40/4cの指致地錠細胞 ( $5 \times 10^4$ ~ $1 \times 10^5$ 細胞/mL) 又は定期培養細胞 ( $2 \times 10^5$ 細胞/mL) から完全RNAを製造した。30分間の熱衝撃 ( $30^{\circ}\text{C}$ ~ $42^{\circ}\text{C}$ ) にかけたMD40/4cの指致地錠細胞からもRNAを抽出した。完全RNAは、本實験に最も適する方法 (1980, Nucleic Acids Res., 8, 1, 2287-2292) によって抽出した。

ノーマンプロット解析を次のように実施した：2.0ugの完全RNAを2.0%ホルムアルデヒド、5.0%硫酸イオン

### 実験 5

#### RNAの製造及び解析

指致地錠細胞 ( $5 \times 10^4$ ~ $1 \times 10^5$ 細胞/mL) 又は定期培養細胞 ( $2 \times 10^5$ 細胞/mL) から完全RNAを製造した。30分間の熱衝撃 ( $30^{\circ}\text{C}$ ~ $42^{\circ}\text{C}$ ) にかけたMD40/4cの指致地錠細胞からもRNAを抽出した。完全RNAは、本實験に最も適する方法 (1980, Nucleic Acids Res., 8, 1, 2287-2292) によって抽出した。

ノーマンプロット解析を次のように実施した：2.0ugの完全RNAを2.0%ホルムアルデヒド、5.0%硫酸イオン

### 実験 6

#### cDNA-HIS3対立遺伝子の選択

HIS3遺伝子を有する1,8kbのβ-珠蛋白フラグメントをプラスミドpMAT09から放出させ (Montiel et al., 1984, 前出引用文献)、1%低量成アガロース (Sigma) 上で精製した。該フラグメントのBamH I位点を削除を、Maniatisらの方法 (1982, 前出引用文献) で、dNTPsとDNAポリメラーゼIのクレモウフラグメントとを用いて実施した。次いでEcoI上位遺伝子の1,2kb EcoI-BamH Iフラグメントを、プラスミドpUC19のポリリンカーゲン内にSmaI-BamH I部位にサブクローニングした。最後に、HIS3遺伝子を含む充電した8%アガロースゲル上に置かれたEcoI-HIS3対立遺伝子を3.0kbのSalI-EcoIフラグメント上に選択させ、低量成アガロース上で精製し、1.0%の酢酸ナウム形態緩衝プロトコル (1983, 前出引用文献) を用いて二倍体株AS3324をリバープロトコル

ホルムアルデヒド中で-80°Cで15分間加熱することにより滅活し、次いで8%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル中で分離した。該RNAを真空ブロッティングでユトロセルロースフィルター (S系S、BA85) にトランスファーし、該フィルターを1.0mMトリス-尿素G1中で5分間煮沸した。ハイブリダイゼーションを、1.0×デンハート緩液、2×SSC、50mMリン酸塩濃度のH6.5、4.0%ホルムアルデヒド、0.1%SDS、4.00μg/mlの1無変性サケ精子DNA及び1~5ng/mlのプローブ由で42°Cで一晩実施した。フィルターを-70°Cで1~5日間オートラジオグラフィーにかけた。使用したプローブは、P.D.I.1遺伝子に由来する0.8kbのβ-珠蛋白-S.40フラグメント (Parikh et al., 1984, 前出引用文献、第2回参照)、並びにpBR322にクローニングしたS. cerevisiaeの18S及び25SリボソームRNA遺伝子の一部分を含むプラスミドScpT (Dr. B. S. Cox, University of Oxfordから入手) である。これらのプローブは、ランダムプライマー修飾 (BCL) で製造業者の指示に従って標識した。

(photo-copoly) に影響を及ぼすのに使用した。

### 実験的

#### La-アセト酸のPDT活性

全タンパク質抽出物における PDT 活性のアセイを、Hill's 法の方法 (1984, Methods Enzymol., 107: 29, 281-282) で実施した。

#### 蛋白質の調製

スクランブルリボタクレーゼ (scrambled ribonuclease) は、ランダムに形成されたダヌルフィド結合を含む完全に脱酰化した混合物である。これは、市販の ( $\Sigma$ -gamma) ワン酵母リボタクレーゼ A から下記の方法で調製する。

リボタクレーゼを、5.0 mM トリス-HCl 液槽液、pH 8.6, 8, 9 M 酸素、1.0 M クチオトレイトール (過酸可逆ダヌルフィド結合に對して約 1.5 倍モル過剰なクチオトレイトール) 中 8.0 mg/ml (約 2.2 mg/ml) で、室温で 1.5 時間～2.0 時間、又は 6.0 まで 1 時間イン

反応混合物を水酢酸で pH 4 に酸化し、その直後に、脱ガスしたり、1M 酢酸で Sebadex C-25カラムから溶離することにより、還元タンパク質を分離する。2.80 ml 中で溶離フラクションをモニターし、タンパク質含有フラクションをブールし、次にリボタクレーゼを標準として對照して、タンパク質濃度を分光光学的に又は化学的に測定する。

還元リボタクレーゼの試料を 0, 1M 酢酸で約 0.5 mg/ml に希釈する。固形炭素を最終濃度 1.0 M まで加え、醋酸カルコシンを 0, 1 M まで加える (カルコシンは酵母原糞液中に存在するシアネートイオンと反応をるために用いられ、カルバミル化によってリボタクレーゼを不活化し得る)。1M トリス-HCl を 8, 5 に調整し、室温で 2～3 回回インキュベートする。その間にタンパク質は大體 0.5 によってランダムに再酰化される。このインキュベーションの後で、5, 8' ニュクオビス (2-ニトロ安息香酸) を用いて差歛キオール基を調べると、再酰化が完了していることが判明する (リボタクレーゼ分量たり 0, 上以下の差歛キオール)。

水酢酸で pH 4 に酸化し、0, 1M 酢酸中で Seba-

dex C-25 から溶離することにより、スクランブル蛋白質を回収する。タンパク質含有フラクションをブールし、1M トリスで pH 8 に調整し、4℃ で貯蔵する。

この方法によるスクランブルリボタクレーゼの收率は通常 9.0～10.0% である。供試物は溶媒中 4℃ で 6 ヶ月まで安定であり、あるいは、5.0 mM NH<sub>4</sub>·HCO<sub>3</sub>, pH 7, 8 中に過浴し、次いで凍結乾燥して、-20℃ で長期保存に耐えし得る白色粉末状固体物質としてもよい。

#### アセイの手順

基質、スクランブルリボタクレーゼは、約 2% の天然リボタクレーゼ活性を有する高分子量 RNA の加水分解開裂では本質的に不活性である。スクランブルリボタクレーゼ中の分子間及び分子内ダヌルフィドの交換の頻繁に伴う PDT の作用は、天然ダヌルフィド結合、天然配座を回復させ、RNA に対するリボタクレーゼ活性を同時に回復させる (concomitant return)。このようにして、PDT の活性を、凍結中にアリコートが採取されるタイミング (time-course) インキュベーションによってアセイし、RNA に対するリボタクレーゼ活性を測定する。

タンパク質ジヌルフィドイソメラーゼの試料を、5.0 mM リン酸ナトリウム液槽液、pH 7, 5 に、最終量が 9.0 ml になるまで加え、1.0 mM クチオトレイトール (1.0 ml の 1M 液槽液) と共に 3.0 ml で 2～8 分間予備インキュベートする。トリス-HCl 液槽液も使用し得るが、その場合は活性が約 2.5% 低下する。次いでアセイを、スクランブルリボタクレーゼの 1.0 μl + アリコート (1.0 mM 酢酸中り、5 mg/ml に 1M ストック液成、毎日新しく調製) の添加により開始し、インキュベーション混合物を 3.0 ml に維持する。より小さい頻度で操作する場合は、前述の量を 1/10 に減少して、最終アセイ量を 1.0 μl とし得る。1.0 μl アリコートを 0.1 分の時点で採取し、その後 2～3 分間隔で 1.0 分毎で採取して、スクランブルリボタクレーゼの再酰化についてアセイする。各アリコートは、3.0 ml で予め平衡化した石英キルベット内で、0, 2.5 mg の高濃度に重合した酵母 RNA (5.0 ml の 5 mg/ml 1M ストック液成) を含む 3.0 ml の KCl (5.0 mM トリス-HCl 液槽液、pH 7, 5, 2.5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) のアセイ混合液に加える。Perkin

カルボキシル基 3-5.6 分光光度計 (パンダ機 2, 5.0 cm) のデュアル波長モードを用いてリボヌクレアーゼ活性を 3.0 ウエーブニクターし、 $A_{260}$  ( $\Delta A$ ) に対する  $A_{264}$  の変化を測定する。RNA 加水分解速度 ( $\Delta A \text{ 分}^{-1}$ ) は 1.5 ~ 2 分にわたって一定である。この速度に基づいてインキュベーションからのアクリートの採取時間とプロットしたグラフは、1.5 分まで直線である。時間推移 ( $t$  time =  $0.001 \text{ 分}^{-1}$ ) の該直線部分の勾配 ( $\Delta A \text{ 分}^{-1} \text{ 分}^{-1}$ ) を三つ組みアッセイの線形回帰分析で計算し (相関係数は決まっており、0.99 である)、タンパク質ジスルフィドイソマーネ活性の測定値とする。

ジオオトシイトールのみによるスクランブルリボヌクレアーゼの非酵素的再活性化の速度を測定するために、酵素試料を省略して対照インキュベーションを実施する。これらの速度は通常  $0.2 \times 10^{-3} \mu\text{M} \text{ A 分}^{-1} \text{ 分}^{-1}$  であり、酵素試料のタンパク質ジスルフィドイソマーネ活性の計算で差し引かれる。

1 単位のタンパク質ジスルフィドイソマーネ活性は、1 リボヌクレアーゼ単位/分の速度でスクランブルリボヌクレアーゼの再活性化を触媒する量であると定義される。

1 リボヌクレアーゼ単位は、1 吸収 (absorbance) 単位/分の  $A_{260}$  に対する  $A_{264}$  の変化を生じる量であると定義される。

### 実験例 8

#### 酵母上 YS 2 及び URA 3 基因 P.D [弱弱カセット] を組込むためのベクターの構築

し Y S 2 での組込みのためのベクターを下記の手順で構築した。プラスミド R C 19 を Hind III で消化し、雄性ベクターフラグメントをゲル精製した。次いでこのフラグメントを Sac II R 3 で消化し、得られた 2.7 kbp の Sac II R 3 1.1 kbp ベクターフラグメントをゲル精製した。精製フラグメントを下記の合成オリゴヌクレオチドと連結した：

5'-AATTGGCCGCCCGGAGCTTGCAGCCCG-3' (配列番号：6)

3'-CCCGGGCGATTCGGAAAGGGGGGGGTCTGA-5' (配列番号：7)

該オリゴヌクレオチドは、Bam H I 付着末端と、Nco I 部位と、Hind III 部位と、Nsi I 部位と、Hinc II 付着末端とをこの順序で含む。得られたプラスミド PUC-NsiI は、両端で Nsi I 部位に直接クラッキングされた單一の Hind III 部位を含む。

URA 3 基因に組込むべき強弱カセットのターダッティングのためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母上 Y S 2 遺伝子源は、Y S 2 T 10 由来する 1.1 kbp の H

ind III フラグメントであった [Parent, S., A., 1986, Yeast, 1, pp. 82-188]。プラスミド PUC-NsiI を Hind III で消化し、子ウシ臍アルカリヌクレオチダーゼで脱リン酸化し、1.1 kbp の Hind III - URA 3 フラグメントと連絡して、プラスミド PUC-NsiI - URA 3を得た。

し Y S 2 基因への弱弱カセットの組込みをターダッティングするためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母上 Y S 2 遺伝子を有するプラスミド YI p 600 [Barre-48, D. A., 等が Science, J., 1986, Mol. Cell. Biol., 6(1), 1, pp. 2828-2838] を Sal I 及び Hind III で消化し、し Y S 2 遺伝子を有する 4.5 kbp の Eco RI - Hind III フラグメントを、予め Eco RI 及び Hind III で消化した PUC 19 にクローニングした。次いでこのプラスミドを Pvu II 及び Bgl II で消化し、し Y S 2 遺伝子を有する 3.7 kbp の Pvu II - Bgl II フラグメントをゲル精製し、蛋白來消化した。プラスミド PUC-NsiI を Hinc II で消化し、子ウシ臍アルカリヌクレオチダーゼで脱リン酸化し、蛋白來消化し、3.7

## 特表平7-508881 (18)

KbのLYS 2 フラグメントを連結した。所期の構造を有する得られたプラスミドを pUC-NcoI-LYS 2 (pNLとも称する)で消化した。

LYS 2での組込みのための第二のベクターも構築した。プラスミド Y1 p 600 を NcoI で消化し、LYS 2 タンパク質コーディング配列の大部分を含む 3.0 kb の NcoI フラグメントをゲル精製し、平滑 (smooth) 来消化した。プラスミド pUC 13 を BamH で消化し、平滑来消化し、3.0 kb の LYS 2 フラグメントと連結して、組込みベクター pUC 13 - LYS 2を得た。

### 実験的 9

#### 既存アセチル化子分離リードに融合したヒトPDIを過剰発生する酵母の構造

ヒトPDIコーディング配列は、Pihlaja ja et al (1987, 前出引用文献)によって記載されている複数部分の cDNA クローン、p210 及び p1 であった。ヒトPDI - cDNA の 5' 末端を有する p210 に由来する 0.45 kb の EcoR I - PstI フラグメントを pUC 18 にクローニングして、プラスミド pK

C 150を得た。次いで該プラスミド pUKC 150 を EcoR I 及び XbaI で消化した (XbaI は成熟ヒトPDIをコードする配列の第三のアミノ酸に対応する位置で切断する)。得られた 0.1 kb のベクター並び (background) フラグメントをゲル精製し、下記の構造のオリガヌクリオチドアグブターと連結した：

5'-ATTCGTTGCGCC-3' (配列番号：8)

3'-GGACTGCAGGCCCT-5' (配列番号：9)

該アグブターと成熟PDI (コーディング配列の 5' 末端を再構成し、所産の分離リード配列への成熟ヒトPDI配列の正確な融合を可能にするような位置に Hind III が設を含む)。

次いで、得られたプラスミド pUKC 150 を PstI で消化し、トリシテアルカリホスファターゼで処理し、ヒトPDIコーディング配列の親指を有するプラスミド pL (Pihlaja ja et al, 1987, 前出参考文献) に由来する 1.5 kb の PstI - PstI フラグメントに連結して、プラスミド pUKC 160 を得た。このプラスミド pUKC 160 を Hind III (前記オリガヌクリオチド内で切断する) で消化し、次いで Hind III で

消化した。その結果得られた、成熟ヒトPDIコーディング配列を有する 1.9 kb の Hind III - Hind III フラグメントをゲル精製し、予め SstI 及び Hind III で消化したプラスミド pGS 4 にサブクローニングした (pGS 4 はアルファ連合因子 (見 Figs 1) プレベロ分離リード配列に融合した酵母 GKA 1 プロモーターを有する; Shaw, K. J. et al, 1988, DNA, 1 17 ~ 126)。平滑来消化した SstI 及び Hind III 末端の間に形成された接合部は、M D 4 1 プレプロリード配列とヒトPDI成熟部分との間の正確なインフレーム接合を構築する (得られたプラスミドは pUKC 161 と命名した (第 4 図))。

LYS 2組込みベクターの NL (pUC-NcoI-LYS 2) を SstI 及び XbaI で消化し、T4-DNAポリメラーゼでの処理によって平滑来消化した。プラスミド pUKC 161 を EcoR I 及び Hind III で消化し、その結果得られた、GA 1.0 プロモーター - アルファ連合プレプロリード - ヒトPDI熟成カセットを有する 2.8 kb の EcoR I - Hind III フラグメントをゲル精製し、T4-DNAポリメラーゼでの処理

によって平滑来消化した。前記平滑来端尾を有しベクター フラグメントと該発現カセットフラグメントを互いに連結し、該連続結合物を用いて既、SacI 位株 ATCC 35691 を感染転換した。所期の構造を有するプラスミドを有するものについて形質転換体をスクリーニングし、得られたプラスミド pNL-MP 4 1 - hPDI を多量に製造した。pNL-MP 4 1 - hPDI を NcoI で消化すると、両端で LYS 2-DNA 配列にランキングされたり、2 kb の発現カセットが得られる。消化したDNAを用いて、スコロプロラスト法 (Hilmanen A. et al, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 75, pp. 1929 ~ 1933)、且、SalI XbaI 位株 B 319 から及び XbaI 188 を形質転換した。NotI 末端はターゲッティングデバイスとして作用しながら発現カセットを染色体 LYS 2 端に向かわせ、該端で前記カセットが被同源挿入を介して組込まれた。形質転換体を、アルファアミノアシシン残基等固体培地で増殖するものについてスクリーニングした (Cobatko, B. B. G., 1979, Genetics, 93, pp. 51; Barnes 及び Thorner, 1986, 前出

参考文献)。このような増殖は、株が「LYS」であることを意味する。LYS 2 プローブを用いて行ったクローニング载体のサザンブロット分析で、表現カセットが LYS 2 位に組込まれたことが確認された。Bacul I で発化した染色体 DNA 四塩盤は、LYS 2 プローブとハイブリダイズするバンドについて、5' 0 から 5' 8 および 9' への断端のサイズ変化を示した。その結果得られた、組込み表現カセットを含む B J 1 8 9 5 及び J R Y 1 8 8 間連鎖を、それを用いて B J 1 9 9 5 / フルファーハ P D 1 及び J R Y 1 8 8 / フルファーハ P D 1 (株 L D 7 2 A) と命名した。

第十一章

腹母PDL又はヒトPDLシグナル配列を用いるヒトPDLを過剰発現する酵母株の構築

Pst I - cDNA ターン p1 (Pst I は lane 1  
から、1987, 前述引用文献) を Pst I で消化し、  
ヒト PDI - cDNA の 3' 領域を有する 1, 5 キロ p の  
Pst I - Pst I フラグメントをゲル精製した。次いで  
該フラグメントを pUKC150 (前記実験 9 に既報)  
の Sac I 位に挿入してプラスミド pUKC151 が得

第六

pUC19を ScGR1及びBamH1で消化し、2.7 kbpのベクターフラグメントをアルファ型DNAポリメラーゼを用いて複製した。下記の

特許平7-508881 (20)  
 た。該プラスミドは、完全な全員ヒト-PDI cDNAを含んでいる。該pUKC151をHindIIIで消化し、適当なオリゴヌクレオチドアダプター（EcoR I認識配列を含む）と連結して、PDI cDNAの5'末端に位置するHindIII部位をEcoR I部位に変換した。得られたプラスミドpUKC153は、2.1kbのEcoR I フラグメント上の完全ヒトPDIコーディング配列を含んでいる。該プラスミドpUKC153をBamR I及びPstIで消化した。その結果得られた、ヒトPDI配列の5'部分及び3'部分をそれぞれ有する0.47kbのEcoR I - PstI フラグメント及び1.7kbのPstI - BamR I フラグメントをゲル精製した。pUC19をBamR I及びPstIで消化し、2.7kbのベクターフラグメントをゲル精製し、次いで前述の0.47kbのEcoR I - PstI フラグメントに連結した。該連結結合物を用いてE. coli上 AATCC35691を形質転換した。所期の構造を有するプラスミドを含む形質転換体からプラスミドDNAを製造した。該DNAをXbaI及びPstIで消化し、ヒトPDI配列の5'部分を有する0.38kbのフラグメントをゲル精

オリゴヌクレオチド #15165-220 及び #15165-240 をキテーゼ処理し、次いでそれぞれオリゴヌクレオチド #15165-221 及び #15165-250 をアニーリングした。ヒト PDI + シグナルペプチド配列を有するヒト PDI を再構築するために、下記の選択を行った。  
 1. pUC19 - 2. TK bp BamH I - EcoR I フラグメント & 1. TK bp PstI - BamR I bp D18' フラグメント、0.38-kbp PstI - AvI 5' + hPDI フラグメント、並びにアニーリングしたリンカ-15165-220 及び #15165-221 を連結した。

既存 P D I シグナル配列を有するヒト P D I を代替端子  
るために、下記の連結複合物を形成した： p U C 19-2.  
7 kbp BamH I - EcoR I フラグメントを 1.7  
kbp PstI - EcoR I - h P D I 3' フラグメン  
ト、0.38 kbp PstI - AvaI 5' - h P D  
I フラグメント、並びにアーニーリングしたリンクー 15.1  
6.5 - 24.9 節段 15.1 6.5 - 25.0 と連結した。〈アニ  
ーリングしたリンクーは BamH I 及び AvaI 付着末端  
を含る。指示されたシグナルペプチド断面及び膜母 5'-非

翻訳サーダー配列をコードする)。

進相混合物を用い、coli I ATCC 35691中に形質転換し、形質転換体を、所期の構造を有するプラスミドを含むものについてスクリーニングした。オリゴタケレオチドオシンカートランкиングDNAとを含む種類にわたって延びるDNA配列を、ジテオキシン配列法を基で確認した。酵母PD-1シグナルペプチド又はヒトPD-1シグナルペプチドを含むするヒトPD-1コードティング配列を、それぞれ $\gamma$ -SP-hPD-1及びhSP-hPD-1と命名した。これらのがセットを含むこのようにして得た二つのプラスミド(それぞれpUC- $\gamma$ SP-hPD-1(第6級)及びpUC-hSP-hPD-1)をSmaI及びBamH1で細化し、その結果得られた、hPD-1カセットを有する1.5kbのフラグメントをゲル精製し、平滑末端化した。

プラスミド p D 0 1 (赤復性 R<sub>4</sub>H 1 部位)によって分離された右上 10 プロモーター及 GADH 1 脱羧ターンオーバーを含む(第 6 番)を R<sub>4</sub>H 1 で消化し、平滑末端生し、前述の方セッタと連結して、それぞれプラスミド p GAL-y SP-h SP 1 及び p GAL-h SP-h SP-D 1 を得た。これら二つのプラスミドを Sma I, Sph I

表格四 11

ヒト PD-1 又は酵母 PD-1 シグナルペプチドを用いるヒト  
PD-1 の C 末端 HDEL 肉脚変異体を過剰発現する酵母株  
の培養

小胞体内に常に存在する酵母タンパク質は通常、小胞体内での保持のためのシグナルである C 末端側のセリオミノ酸配列を含む (Pethamら, 1983, 前出引用文献)。これに対し、ヒト PDI は、酵母内での ER 保持に際しては全く機能しないことが明らかにされた (Lewis ら, 1990, Cell, 61, pp. 1359-1363) C 末端 KDEL 配列 (PabialaJanietz ら, 1987, 前出引用文献) を有する。従って、C 末端 KDEL が HDEL に変化している若者ヒト PDI は機能することが裏付けられた。これは下記の方法で確認された。

二つのプラスミド pUC- $\lambda$ SP-hPDI 及び pUC-hSP-hPDI (実施例 9) を EcoRI 及び XbaI で消化し、その結果得られた、ベクター配列と hPDI 配列の 5' 端部分を含む 0.6 kbp の EcoRI - XbaI フラグメントと、hPDI コードィン配列の中間部分を含む 0.5 kbp の XbaI - XbaI フラグメントと

特表平7-508881 (21)

及び ScaI で消化し、その結果得られた、G A L 1 0  
p - h S P - h P D I 及び G A L 1 0 p - h S P - h P D  
I 発現カセットを有する 3. 2 k b p の SmaI - Sph  
I フラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、改めて S  
S 2 遺伝子ベクターハ U C E 3 - 1 Y S 2 の XbaI 部位  
(平滑末端化した)に挿入した。得られたプラスミドを、  
それぞれ p L Y S 2 - h S P - h P D I 及び p L Y S 2 -  
y S P - h P D I と命名した。

組込み形質転換のために、前回二つのプラスミドを B  
I 及び Sac I で消化して、LYS 2 フランキンガ末端  
 を有する短形フラグメントを形成し、放線形フラグメント  
 を用いて酵母株 BJ 1 9 9 5 及び JRY 1 8 8 を形質転換  
 した。承認の発現カセットを LYS 2 に組込んだ形質転換  
 体を、BJ I で消化したダノム DNA のナサンプロット  
 によって同定し、次いで LYS 2 プローブとハイブリダイ  
 ズした。用られた株は、BJ 1 9 9 5 / hSP-hPDI、  
BJ 1 9 9 5 / ySP-hPDI、JRY 1 8 8 / hSP  
 - hPDI (株 # 1 1 4 8) 及び JRY 1 8 8 / ySP-  
pPDI (株 # 1 1 5 7) であった。

をゲル精製した。次いで下記のオリゴヌクレオチドアダプターを合成した。

5'-GACGACCTGGAGGCGCTTUGAAGAAAGCAGAGGAGGACGACATGGAGGAA-3'  
 3'-CTCTGGAGGCGCTTGGAGGCGCTTCTTGCTGGCTGCTCTGAACTGGCTT-5'  
  
 GACGATGACCAGAAGCTTCCACGATGAACTGTAAGGAATCCG-3'  
 (引物Ⅱ号 -14)  
 CTGCGACTGCGCTTCGACAGCACTTGCGACATTGCTAGGCCTAA-5'  
 (引物Ⅲ号 -15)

二つのオリゴのアニーリングに次いで、該アグブターを XhoI で消化し (EcoR I 及び XhoI 付着末端が得られる)、二つの側鎖の反応で、それぞれ 5' - γ SP - hPDI 又は 5' - hSP - hPDT 配列を含む 4. 0 kb の EcoR I + XhoI ベクターフラグメントと連結した。得られた二つのプラスミドを XbaI で消化し、hPDI コーディング配列の中間部分を含む前述の 0. 5 kb の XhoI - XhoI フラグメントを連結し、ヒト PDI コーディング配列を再構築するため XbaI フラグ

## 特表平7-508881 (22)

メントが並列な方向で挿入されたプラスミド pUC-S-P-hPDI (HDBL) 及び pUC-ESP-hPDI (HDBL) を得た。これら二つのプラスミドを BamH I で消化し、発現カセットを有する二つの異なる 1. 5 k bp の BamH I 部位に挿入して、それぞれ pUC-GA 及 1.0 p-ySP-hPDI (HDBL) 及び pUC-GA 及 1.0 p-ySP-hPDI (HDBL) を得た。これら二つのプラスミドを SmaI, SphI 及 ClaI で消化した。得られた二つの 2. 5 k bp の SmaI-Sph I フラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、次いで、その ClaI で消化しておいた pUC13-LYS2 を連結し、平滑末端化した。得られた二つのプラスミド pLYS2-ySP-hPDI (HDBL) 及び pLYS2-ySP-hPDI (HDBL) を HpaI 及び BamR V の消化によって断続化し、次いで脱脂の反応で株 B 1995 及び B 1888 の形質転換液に導入した。LYS2 形質転換体を、アルファアミノアシビン酸合有酵母体確実性で選択した。LYS2 座に組み込んだ両種の発現カセットを含む導入体を、ゲノム DNA のサザンプロット分析によって

同定した。組られた株を、BJ1995/ySP-hPDI (HDBL), BJ1995/ySP-hPDI (HDBL), JRY188/ySP-hPDI (HDBL) (株 #1268) 及び JRY188/ySP-hPDI (HDBL) (株 #1267) と命名した。

## 実施例 1-2

標準アルファ 四子分離リーダーを用いるヒトPDIのC末端HDBL突然変異を選別検出する酵母系の構築

プラスミド pUKC161 (第4図) を BamH I 及び ClaI で消化し、アルファ四子プレプロリード型列と hPDIの5' -セグメントとを有する 0. 7 k bp の BamH I-Cla I フラグメントをゲル精製した。プラスミド pUC-ySP-hPDI (HDBL) (実施例 1-1 に記載) を ClaI 及び BamR I で消化し、C末端HDBLセグメントを有する hPDIの3' キャグメントを含む 1. 0 k bp の ClaI-BamR I フラグメントをゲル精製した。pUC19を BamH I 及び BamR I で消化し、得られたベクターフラグメントを、0. 7 k bp の BamH I-Cla I フラグメント及び 1. 0 k bp の ClaI-

EcoR I フラグメントの両方と連結してプラスミド pUC-MFα1-hPDI (HDBL) を得た。該プラスミドを BamH I で消化し、PDIカセットを有する 1. 7 k bp の BamH I-BamH I フラグメントをゲル精製し、プラスミド pA01 (第6図) の BamH I 部位に挿入して、プラスミド GAL-MFα1-hPDI (HDBL) を得た。次いで該プラスミドを BamH I 及び SphI で消化し、その結果得られた、発現カセットを有する 2. 6 k bp の SmaI-Sph I フラグメントをゲル精製し、平滑末端化した。pUC13-LYS2ベクターを ClaI で消化し、平滑末端化し、次いで脱脂の 2. 6 k bp 平滑末端化フラグメントに連結した。得られたプラスミド pLYS2-MFα1-hPDI (HDBL) を HpaI 及び EcoR V で消化し、次いで株 JRY188 及び B 1995 の形質転換液に導入した。得られた形質転換体を (実施例 1-1 に記載のように) ゲノム DNA のサザンプロットで解析し、所望の発現カセットが LYS2 座に組込まれていることを確認した。JRY188 形質転換体を株 #1279 と命名した。

## 実施例 1-3

LYS2座の組込み発現カセットから酵母PDIタンパク質を選別検出する酵母系の構築

完全酵母 PDI1 遺伝子を有するプラスミド C7 (実施例 4 に記載) を EcoR V で消化し、酵母PDI 横断リード (ORF) の C末端部分 (アミノ酸 233 から ORF の末端まで) と 3' 翻訳領域とを含む 1. 8 k bp の EcoR V-EcoR V フラグメントをゲル精製し、プラスミド pAT163 (Twigg, A. G. 及び Sherratt, E. D., 1989, *Nature*, 282, pp. 216-218) の EcoR V 部位に挿入して、pUK169を得た。次いでプラスミド C7 を BamI 及び EcoR V で消化し、酵母PDI ORF のアミノ酸 6~222 をコードする 0. 67 k bp の BamI-EcoR V フラグメントをゲル精製し、下記の合成オリゴヌクレオチドアプライマーと連絡した:

5'-GATCCACGAGAACATGATGCTG-3' (配列番号: 10)

5'-CTTGTTCGGTTTACTTCAGAGACGCCCG-3' (配列番号: 11)

該オリゴヌクレオチドアプライマーはそれぞれ BamH I 及び BamI 付着部位を有し、酵母PDI ORF のアミノ酸 1~5 及び 1~2 基差別の部位も、非翻訳リード配列を含

### 特許平7-508881 (23)

コードする。(ATG開始コドンは下線で示されている)。得られた後、7 kbpのBamH I - EcoRVフラグメントをゲル精製し、次いで、予めEcoRV及びBamH Iで消化しておいたpAT153にサブクローニングして、プラスミドpUKC170を得た。

プラスミドpUKC169をEcoRVで消化し、その結果得られた、酵母PDIの断片の末端部分を有する1、3 kbpのEcoRV - EcoRVフラグメントをゲル精製し、次いでpUKC170の非反復EcoRV部位に挿入し、それによって無黒の(完全な)酵母PDI (yPDI)遺伝子を再生した。このようにして得たプラスミドをpUKC175と命名した。

pUKC175をEcoN Iで消化し、yPDI遺伝子を有する得られた2、3 kbpフラグメントを平滑末端化し、ゲル精製した。pUC19をSacI及びSmaIで消化し、平滑末端化し、前記平滑末端化EcoN I - yPDIフラグメントと連結した。既述器具の物を用いてE. coli DH5細胞を形質転換し、得られた形質転換体を、pUC19ヨリサンカード内のBamH I部位がyPDIコードィング配列の3'末端に隣接して配置されるよう

に適当な方向でpPDI挿入体を有するプラスミドを含むものについてスクリーニングした。EcoN「フラグメント上のyPDI - ORFの5'末端にはBamH I部位が既に存在していたため、該部位(pUC19 - yPDIと命名)体との時点で、1、7 kbpのBamH Iフラグメント上にyPDI - ORFを含む。pUC19 - yPDIをBamH Iで消化し、yPDI遺伝子を有する1、2 BamH I - kbpフラグメントをゲル精製し、次いでベクターpUC18 - GAL10 p (B) ADH1 t (ストック#401) (第6図) のBamH I部位にサブクローニングした。得られたプラスミドpUC18 - GAL10 p - yPDI - ADH1 t (第7図) はストック#1015である。プラスミドpUC18 - GAL10 p - yPDI - ADH1 tをSmaI、SphI及びSacIで消化し、発現カセットを有する2、7 kbpのSmaI - SphIフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、次いでpUKC171 (pUKC171は、予めEcoR I及びHindIIIで消化しておいたpUC19にサブクローニングしたY1p600 (Baracos及野田Harone r, 1986, 前出引用文献) のも、5 k EcoR I -

HindIII - LYS2フラグメントを含む)の非反復SacI (部位にクローニングした。得られたpUKC171 - GAL10 p - yPDIベクターをEcoR I及びPvuIIで消化してLYS2 - GAL10 p - yPDI - ADH1 t - LYS2カセットを導入し、これを用いてS. cerevisiaeを株RY188及びRY1995を形質転換した。得られたLYS2形質転換体を、実施例9に記載のように、ゲノムDNA複製物のサザンプロットにより評価した。LYS2座に組込まれたGAL10 p - yPDIカセットを有する各株の平板が検出された。得られた株をBJ1095 / yPDI及びRY188 / yPDI (株#1152)と命名した。

#### 実験例 14

##### URA3座からの組込み発現カセットから酵母PDIを過剰誘導する酵母株の構築

プラスミドpUC-Not - URA3 (実施例8) をSalI及びNcoIで消化し (URA3遺伝子の一部を欠失させるため)、平滑末端化した。プラスミドpUC18 - GAL10 p - yPDI - ADH1 tをEcoR I、

SacI及びSphIで消化し、GAL10 p - yPDI - ADH1 t発現カセットを有する2、8 kbpのEcoR I - SphIフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、前記ベクターフラグメントと連結して、プラスミドpNU - GAL10 p - yPDIを得た。Not Iでの消化により、pNU - GAL10 p - yPDIからURA3 - GAL10 p - yPDI - ADH1 t - URA3組込みカセットを取り出した。得られた線形フラグメントを用いて酵母株KHY107を形質転換した。5-フルオロ-オロモ酸有固体培地上で (Beckel, 1984, Mol. Genet. Genet., 197, pp. 345)、ura3形質転換体を選択した。得られたura3形質転換体に由来するゲノムDNAをEcoIで消化し、GAL10 p - yPDI - ADH1 tカセット由来の放射性標識したE. coli R1 - PvuIIフラグメントをブローットとして用いて、サザンプロットにより評価した。所産のGAL10 p - yPDI - ADH1 t発現カセットをURA3に組込んだ單體株が同定された。单體株K - Y1は、URA3に組込まれた複数のコピーを有していた (株#1136)。单體株K - Y2は、URA3に組まれたコピーを一つだけ

者していた（特許1137）。

### 実験例 1.5

#### 細胞内液中のアドンタンパク質の検出

酵母株を、 $3 \times YEPD$  培地培地で、23℃で24時間増殖させた。24時間が経過した後、培養物にガラクトースを最終濃度4、8%まで加えた。次いで培養物を23℃で更に24時間再インキュベートした。あるいは、酵母株を $3 \times YEPD$  で30℃で24時間培養した。細胞を回収し、無菌冷水で洗浄し、同量の $3 \times YEPD + \text{ガラクトース}$ 培地に再懸濁させた。酵母株を更に16～20時間インキュベートし、その後回収し、タンパク質を抽出方法2（下記）で抽出した。

#### タンパク質の抽出：

本實例にMenzel-Gittermannの方法（1963, Gene, 24, p. 1～14）に従い、ガラスビーズ破壊法を用いて、細胞壁粗朢又は正常期細胞からタンパク質を抽出した。

方法1：2mlのMerrin液を最終濃度0.7、0.6のPMSF（0.5 mM）の存在下で細胞壁のガラスビーズ破壊を

行い、次いで酵糖-脱脂サイクリルにかけてタンパク質を抽出し、13,000 rpmで10分間の遠心分離により可溶性タンパク質を回収した。PBG（固体）、硫酸アンモニウム（0～80%）又は紫外遮光液（<100 kDa）での着色の弱又は強で、落葉培養液の分離により最初に分離を終了した。タンパク質濃度はBradfordの方法（1976, Anal. Biochem., 72, p. 248～254）で測定した。

方法2：方法1に従って、但し培養培地にNaOH及び9-メルカプトエタノール各（それぞれ最終濃度0.2 M及び1%）加え、水上に約10分間放置し、その後TECAを最終濃度8%で加えて、細胞内試料を調製した。水上で30分間静置した後、遠心分離によってタンパク質を回収し、冷アセトンで洗浄し、SDS-PAGEローディング液面に再懸濁させた。

50 μgの企可溶性タンパク質を、本實例にSchäggerからの方法（1987, Gene, 54, p. 118～23）に従って、一次元SDS-PAGE（12%ボリアクリルアミド）とクーマシーブルーカラートで分析した。

次の条件で電気泳動を実施した：1.0% SDS-ボリア

クリルアミドゲル及びレーン当たり1.0 μgのローディングされたタンパク質（タンパク質抽出方法1）。毎のゲル中でSigma蛋白染色分子量標準を用いた。ゲルはBio-Rad mini-Protean II ゲルシステムで操作した。タンパク質濃度を計算せずに、細胞外液抽出物をレーン当たり1.5～2.0 μlでローディングした。電圧は200Vボルト以下に維持した。

Bioimager半乾燥ウエスタンプロットシステムを用いて、タンパク質をニトロセルロースにトランスファーした。ニトロセルロース膜を5%（w/v）勃乳蛋白で1時間ブロッケし、洗浄し、1:500～1:750の希釈度で3時間から一晩にわたり、或ヒトPDI+ボリクオーテル抗体と共にインキュベートした。膜を洗浄し、ペルオキシダーゼ結合抗サギJ5Gを最終希釈率1:100で加え、インキュベーションを1時間続ける。洗浄後、Amersham ECLシキットを製造業者の指示通りに使用して、プロットを発色した。

最初のアッセイでは、株3072Aが分離したPDIをウエスタンプロットで検出できるレベルで産生することが示明した。使用したECLプロトコルでは、検出レベルは0.

05 μgの精製ウシPDIであった。この分離PDIには、100 kDaカットオフ紫外遮光液によって保持されたため、二量体であることが判明した。株3072Aと対応するHDEも該株（1279）とを比較すると、ヒトPDIは双方から分離されていた。この実験では、最終培養ノ培養条件を、増殖温度（℃）及び培養期間について最適化した。前記二つの株は、23℃で培養し次いで30℃で16時間培養するか、又は30℃で18時間培養し培養すると、より高いPDI合成レベルを示した。

### 実験例 1.6

#### 細胞内でアンチスタシンを発現させたためのベクターの開発

アンチスタシンは血液凝固因子Xaの強力なタンパク質阻害物質である。アンチスタシン（ATs）は、メキシコヒル*Hemimenteria officinalis*の唾液腺から単離された（Nuttall, B. L., 1988, J. Biol. Chem., 263, p. 10162～10167）。その後、ATsをコードするcDNAがHann, P. H. らにより単離され、性質が解明された（1989,

## 特表平7-506881 (25)

(配列番号: 1 9)

Gene, 7-5, pp. 47-57)。ATSは、組換え導入によって分離された異種タンパク質中の折り畳み及び構造的なジスルフィド結合の形成に対する高レベルのPDI活性の影響を評価する上で理想的なリボータンパク質である。なぜならATSは、タンパク質が生物学的性質を有するようにするために正確な対を形成しなければならない10個のジスルフィド結合を有するからである。

発現ベクターpK4α2 (Jacobson, M. A.ら, 1989, Gene, 85, pp. 511-516)を用いて、酵母内でATSを発現させた。前記ベクターは、ガラクトース誘導性GAL4プロモーターと、異種タンパク質の分離を利用してための酵母MFTα1プレプロ分離リーダー配列を含む。ATSをコードする配列は、クリーンスコア (Ham, J. H. ら, 前出引用文献)に由来するサブクローニングしたATS cDNAを基質として使用し且つ下記のオリゴタクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で合成した。

1. 5'-ATGGGATCCCTGCTTGGATAAAGACAGGACATTGGAC  
CGCGGTGT-3' (配列番号: 1 8)

2. 5'-TGTGGATCCCTATGATTAACCGTGGGATAGCTT-3'

これらのプライマーは両方とも、PCR産物のサブクローニングを容易にするためにBamHI部位を含む。第一のプライマーは、酵母K4α2 γSP-hPDIプロテアーゼ開裂部位 (Lyte-Arge) N末端を、成熟 ATS の第一ミノ酸残基に挿入する (酵母γSP-hPDIプロテアーゼは該配列中のLyte-Arge部位のC末端側で開裂する)。PCR産物をBamHIで消化し、ゲル精製し、次いでBamHI消化pK4α2に連続して、pK4α2/ATS (K9-91) (図8)を得た。次いでこの発現ベクターを用いて、スフェロプラスチ法 (Hollandら, 1978, 前出引用文献) で、図9に示す酵母細胞株を形質転換した。

ロイシンを含まない培養液体 (Sehgal et al., L. G., 1987; Gene, 61, pp. 123-133) 上で形質転換体を選択し、クローン単離体についてストリーグし、これらの単離体を遺伝的分析で使用した。株は、1.7%グリセロール含有合成培地内で-70°Cで貯蔵することにより保存した。

## 表1

形質転換株	寄主株	元の株	PDI+カセット
956	239	JRY186	なし
1165	1672A	JRY188	アルファ-hPDI
1176	1157	JRY188	γSP-hPDI
1275	1168	JRY188	βSP-hPDI
1293	1279	JRY188	αIpha-hPDI(HDEL)
1294	1267	JRY188	βSP-hPDI(HDEL)
1295	1268	JRY188	γSP-hPDI(HDEL)
1177	1252	JRY188	γPDI
1106	546	KRY107	なし
1254	1136	KRY107	γPDI-A1
1155	1137	KRY107	γPDI-A2

\* PDIカセット及び株は次のように実施例に記述されている: アルファ-hPDI、実施例9: γSP-hPDI 及び βSP-hPDI、実施例10: βSP-hPDI (HDEL) 及び γSP-hPDI (HDEL)、実施例11: γPDI、実施例12: γPDI-A1 及び γPDI-A2、実施例14。

\* 形質転換株はK9-91アンチスタシン発現ベクターを含む。

## 実施例 1 7

## アンチスタシンの分離に関する結果及びPDI活性発現

## の指定期の説明

K9-91形質転換株JRY188株と、酵母もしくはヒトPDI+を過剰産生する種々の形質転換株と、下記の方法でアンチスタシンの分離に関して評価した。指示された株を-70°C冷凍グリセロールストックからロイシン素含有合成寒天プレート上にストリーグし、30°Cで3日間増殖させた。5 mlの3%YEHD (60 g Difco) の酵母培地、3.0 g Hy-Soyバブトン、4.8 gグルコース/升) 培地を入れた培養管 (1.8×15.0 mm) に小ループ一杯の細胞を接種し、遠隔培養コーティング面上で23°Cで約18時間インキュベートした。この段階で、ガラクトースを最終濃度4.8% (w/v) で加えて細胞を培殖し、培養物を23°Cで更に3日間インキュベートした。次いで、遠心分離で細胞を回収し、清濁化培地上清をアンチスタシン活性のアッセイのために保持し、活性性を因子A2活性の測定によって測定した [Nishi et al., 1988, 前出引用文献]。結果は三つ組みで実施した。結果を要約して表2に示す。

表2

株	μg A T S / L. 0 0 0	相対レベル
JRY188	25.6	1.0
JRY188/hSP-hPDI	24.4	0.95
JRY188/ySP-hPDI	28.4	1.11
JRY188/alpha-hPDI	27.2	0.9
JRY188/yPDI	65.1	2.54

## 菌株名 1.0

J R Y 1 8 8 & D H D B し実験薬理形ヒトP D I を過剰発生する菌株によるアンチエストラジン分泌の評価

K 9 9 1 形質転換 J R Y 1 8 8 と、三つの異なる分離コードーを有する H D B し実験薬理形ヒトP D I を過剰発生する形質転換菌株とを実施例 1.7 に記載のように増殖し、清澄化培地を上清を、実施例 1.7 に記載のように因子 X α 植客アッセイで分泌 A T S レベルについて評価した。結果は表 3 に示す。

表2

株	μg A T S / L. 0 0 0	相対レベル
JRY188	18.0	1.0
JRY188/hSP-hPDI(MDEL)	27.5	1.53
JRY188/ySP-hPDI(S263)	29.3	1.63
JRY188/alpha-hPDI(S263)	31.3	1.74

## 菌株名 1.0

菌株名 J R Y 1 0 7 及び背景 P D I を過剰発生する菌株によるとアンチエストラジンの分泌

K 9 9 1 形質転換 J R Y 1 0 7 と、背景 P D I を過剰発生する株の形質転換菌株とを増殖し、清澄化培地を上清を、実施例 1.7 に記載のように因子 X α 植客アッセイで分泌 A T S レベルについて評価した。結果は表 4 に要約して示す。

表4

株	A T S (μg/L)	A629	A T S / A629
KHY107 A1	0.314	23.9	0.013
KHY107 A2	0.148	24.5	0.006
KHY107 A3	0.334	25.5	0.013
K-Y1 A1	1.106	24.8	0.047
K-Y1 A2	1.469	21.8	0.067
K-Y1 A3	1.483	23.3	0.065
K-Y3 A1	3.856	29.0	0.099
K-Y3 A2	2.164	51.2	0.042
K-Y3 A3	1.929	49.0	0.040

K-Y1 B、U R A 3に多重コピ-G A L-γ P D I を有する K H Y 1 0 7 である。

K-Y3 B、U R A 3に單一コピ-G A L-γ P D I を有する K H Y 1 0 7 である。

A 1、A 2 及び A 3 は、平行して評価した指示された株の種々のクローン單離体を示す。

背景 P D I の過剰発現の結果、單離体 K-Y1-A1 の場合は、A T S 滲性の分泌が標準当たりベースで 9 倍に増加し、空唐ベースで約 9 倍の分泌が観察される。

## 菌株名 2.0

多重コピープラスミドから酵母 P D I はヒトP D I を過剰発生する形質転換株の構造

多箇コピードループレベクター Y B p 2.4 (S o t s  
lein, D. S., 1979, Gene, 8, pp. 17  
- 24) は、酵母 2 ミクロンDNA 複製起点と、ウラシル無含有合成培地で選択するための酵母 U R A 3 遺伝子を含む。Y B p 2.4 を B a m H I で消化し、得られた 7.8  
k b p の B a m H I ベクター・フラグメントをゲル精製した(フラグメント a)。プラスミド U R C 1.8 - G A L 1.0  
P - γ P D I - A D H 1 (C # 1 0 1 5) を B c o R I、  
S p h I 及び S a l I で消化した。その結果得られた、G  
A L 1.0 P - γ P D I - A D H 1 で脱酰カセットを有する  
2.8 k b p の E c o R I - S p h I フラグメントをゲル  
精製した(フラグメント b)。プラスミド U R C 1.6 1

を SECR I 及び Hind I I I で消化し、GAL1 p - MFα 1 プレプローベト PDI 発現カセットを有する 2.8 kbp の EcOR I - H ind I I I フラグメントをゲル精製した（フラグメント c）。前記三つのフラグメントを平衡末塩析し、次いで下記の手順で互いに連結した：（1）ベクターフラグメント a 及びフラグメント b を互いに連結してプラスミド YEp24 - GAL10 p - YPDI（第 1 図）を得る；（2）ベクターフラグメント a 及びフラグメント c を互いに連結してプラスミド YEp24 - GAL10 p - MFα 1 - h PDI（第 10 図）を得る。得られた前記二つのプラスミド DNA の大規模 C<sub>s</sub> C<sub>i</sub> 製造を行った。二つの切片の形質転換反応で、酵母株 JRY188 を用いて発現ベクター K 893（実験例 1 6）及び YEp24 - GAL10 p - MFα 1 - h PDI もしくは YEp24 - GAL10 p - MFα 1 - h PDI で同時形質転換した。両方のプラスミドを含む形質転換体を、ロイシン及びウランブルの両方を失した合成培地で選択し、单離した酵母株（single colony）を同一培地上で再ストリーカしてクローン単離株を選択した。二つの先の同時形質転換の各々について 5 個の前記クローン単離株を、培養管内の

5 ml の S X Y 培地に接種し、組換え酵母ローラードラムで 2.3 度で 2.4 時間インキュベートした。2.4 時間が経過した後、ガラクトースを最終濃度 4% 及び 8% で加え、培養物を 2.3 度で翌に 5 日間インキュベートした。遠心分離によって細胞を回収し、清浄化培地上清を因子 X α 選択アセイで ATS 活性レベルについてチェックした。YEp24 - GAL10 p - MFα 1 - h PDI プラスミド及び ATS 発現ベクターを含む同時形質転換体は、ATS 発現ベクターのみを含む親 JRY188 株と比べると、単離体に対して 3 ~ 2.8 倍の分離 ATS 活性レベルを示した。YEp24 - GAL10 p - MFα 1 - h PDI プラスミドと ATS 発現ベクターとを含む同時形質転換体は、ATS 発現ベクターのみを含む親 JRY188 株と比べて、2 ~ 3 倍の分離 ATS 活性レベルを示した。

### 実験例 2.1

既述の複数クローンパック型の発見に使用した同一発現ベクターから單離又はヒト PDI 上部遺列產生する酵母宿主株の構造及び評価

#### S. cerevisiae GAL1 及び GAL10 酵

母子を、分歧型 (divergent) GAL4 RIFGA 及 10 プロモーターと共に二つのプロモーターの TATA ルボックスの間に位置する共通の A と T 結合ドメインとを含む二つの構造遺伝子の間の領域から分歧的に (divergently) 製作した。プラスミド pBMB272 (Johanson, M. 及び Davies, R., 1984, Mol. Cell. Biol., 4, p. 1, 1440) は、この分歧型酵母 GAL1 - GAL10 プロモーターを、S. cerevisiae の RIFGA 及 Hind I I I フラグメント上に含む (見図 1 1) 部位に挿入した内部 2.8 kbp の部位も有する。このプロモーター-フラグメントを使用して、分歧型プロモーター-カセットベクター pUC - GAL1 / 10 を構築した。該ベクターは次の船団を有する：発現反応 Bam H I 及び Sm 1 酶により、この順序で、酵母 AD H I 転写タームネーター (0.35 kbp - Hind I I I - Bam H I フラグメント) から分離した酵母 GA L 10 プロモーター。非接頭 Bam H I 及び Hind I I I 酶により AD H I 転写タームネーターの最初のコピーから分離した酵母 GA L 1 プロモーター。二つの AD H I タームネーター-ループメントの 3' 末端は、分歧型プロモーター

発現カセット全体を Spo h フラグメントとして単離できるよう、Spo h 領域によってフランギングされている。このプラスミド内のベクター三脚は、オリジンマーの代わりに前記発現カセットを有する pUC18 である。

プラスミド pUC - GAL1 / 10 を Bam H I で消化し、ゲル精製してフラグメント「a」を形成した。プラスミド pUKC161 を Bam H I で消化し、成熟ヒト PDI リコーディング配列にインフレーム融合したアルファ因子プロプロリーゼを有する 1.9 kbp の Bam H I フラグメントをゲル精製し、ベクターフラグメント a に連結して、プラスミド pUC - GAL1 / 10 - h PDI を得た。該プラスミドでは、アルファ因子プロプロリーゼ h PDI 融合が GA L 1 プロモーターの制御下にある。プラスミド pUC18 - GAL10 カード PDI - ADH1 t (実験例 1 3) を Bam H I で消化し、その結果得られた、酵母 PDI リコーディング配列を有する 1.7 kbp の Bam H I フラグメントをゲル精製し、次いでベクターフラグメント a に連結して、プラスミド pUC - GAL1 / 10 - t PDI を得た。該プラスミドでは、GA L 1 プロモーターが酵母 PDI t の発現を制御する。このようにして得た二つのブ

### 特表平7-508881 (28)

ラスミドを SphI で消化し、平滑末端化し、それぞれ hPDI 及び yPDI カセットを有するベクターフラグメントを獲得した。

ATS発現ベクター (K991) を SalI 及び BglI で消化し、既熟 ATSのコードィング配列にインフレーム適合したアルファ因子プロモーターを有する SphI - BglI フラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、同様の反応で二つの平滑末端化ベクターフラグメントを及びて連絡した。別報地図で調べて正確な構造を有する得られたプラスミドを、それぞれ pUC-GAL11/10-yPDI/ATS (第1回) 及び pUC-GAL11/10-yPDI/ATS (第2回) で消化した。これら二つのプラスミドを SphI で消化して発現カセットを遊離させ、hPDI 間連又は yPDI 間連発現カセットを有するフラグメントを、予め SphI で消化した酵母シトルベクターカオリ/1 (Rosenthaler, S., S., 1984, Nature, 312, pp. 77-80) と連結した。その結果、二つのプラスミド、pC1/1-GAL11/10-hPDI/ATS 及び pC1/1-GAL11/10-yPDI/ATS が得られた。これらのプラス

ミドでは、ATS及びPDI 間連発現カセットが、それぞれ GAL10 及び GAL1プロモーターの制御下で同一の高コピー数ベクター上に存在していた。

次いでこれら二つの発現ベクターを用いて、酵母株 JRY188、S/J1995 及び他の適当な酵母宿主株を形質転換した。形質転換体をヨイシン液槽内培地上で選択し、得られた形質転換体を、上説実施例に記載のように、ATS 及び PDI の発現／分泌について評価した。

表5 (下記) に示す結果から明らかのように、hPDI を過剰発現する形質転換体は、pKH4α2/ATSのみを含む对照株と比べて最高高いレベルのアンチスクランジングを示す。また、酵母 PDI を過剰発現する形質転換体は、对照株と比べて 3~17 倍高いレベルのアンチスクランジングを示す。

表5

形質転換体	アンチスクランジング (ng/L)*
<u>pGAL11-GAL11/10-hPDI/ATS</u>	
単體 1	4.2
単體 2	5.3
単體 3	3.9
単體 4	4.6
単體 5	5.1
<u>pGAL11-GAL11/10-yPDI/ATS</u>	
単體 1	3.9
単體 2	11.7
単體 3	3.6
変異株	
単體 4	26.0
単體 5	8.2
JRTies 実際	1.5

\* 23°Cで培養後 5 日目の収量。

実験例 2-2

#### PDI過剰発現酵母宿主株によるアンチスクランジング分離の增加に対する温度の効果

アンチスクランジング発現ベクター pKH4α2/ATS 及び YEP24-GAL11-p-MFα-hPDI もしくは YEP24-GAL10カーリーPDI で同時形質転換した株 JRY188 の選択した形質転換体を、23°C又は30°Cでの増殖後にアンチスクランジング分離について評価した。アンチスクランジング発現ベクターのみで形質転換した株 JRY188 を平行して増殖した。30°Cで増殖で23°C又は30°Cで一挙増殖した後、カラクタースを最終濃度4~8%で加えて細胞培養液を過濾し、23°C又は30°Cの適当な温度で更に6日間増殖した。培養後3~6日で採取した培養液を、因子 Xa 恒温アッセイにより分離アンチスクランジングレベルについて評価した。著者の結果から明らかなように、アンチスクランジング発現体、PDIを過剰発現する他の形質転換について、培養後3日目及び5日目の両方で、温度を30°Cにした時よりも23°Cにした時の方が確かに大きかった。

表6

品種名	温度 (°C)	アンチスクランディング		ブチド(TAP)の公報
		2日目	5日目	
uPDI-1	20	0.83	2.11	マダニ抗凝血ペプチド(TAP)は、血栓凝固因子Xaの強力な高選択性阻害物質である [Waxman, L. G., 1990, <i>Science</i> , <u>248</u> , pp. 593-596]。TAPはマダニ <i>Oribatidios moulata</i> から単離された新規のセリンプロテアーゼ阻害物質である。TAPは、G型のンスティン族を含む60個のアミノ酸からなる (Waxmanら, 1990, 断山引用文献)。TAPは、ガラクトース糖基化 <del>を</del> 1-O-ブロモ- <u>ト</u> クと、TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム組合した酵母 <del>酵母</del> <u>E. coli</u> プレプロリードー配列と共に発現ベクター pKH4-TAPを用いて、酵母内で発現された (Neeser, M. G., 1990, J. Biol. Chem., <u>265</u> , pp. 17746-17752)。このベクターは、プレプロリードーのアミノ酸79の位置に配置された <u>Bam</u> H I クローニング部位の存在に起因して、少し改変された <u>Kpn</u> I プレプロリードー配列を含む (Neeserら, 1990, 初出別月文献)。
uPDI-2	20	1.34	2.68	
uPDI-3	20	3.93	10.25	
uPDI-4	20	3.00	13.42	
JRY189 外観	20	0.38	0.65	
uPDI-1	30	0.49	0.47	
uPDI-2	30	0.42	0.47	
uPDI-3	30	2.29	6.65	
uPDI-4	30	2.71	2.56	
JRY189 外観	30	0.34	0.30	

\* 各々のuPDI「单離体」は、アンチスクランディングベクターK99I及びYEp24-GAL10p-MFea-hPDIの両方を含んでいた。uPDI「单離体」は、ベクターK99I及びYEp24-GAL10p-uPDIの両方を含んでいた。

TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム組合した真正(*authentic*) Mfα1 プレプロリードー配列を含む第二のTAP発現ベクター pKH4-3B/TAPを構築した。合成TAP遺伝子を含むプラスミドpKH4-TAP (Neeserら, 1990, 初出別月文献)を、合成TAP遺伝子の5'末端及び3'末端をそれぞれ改変するために、下記の二つのオリゴヌクレオチドプライマー

5'-TACAGCCGTC TGTGGCTCAA-3' (既別番号: 20) 及び  
5'-ACTGGATCCC ATTTTACCT TCGATGCCAG CCT-3' (既別番号: 21)

を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で、DNA構型として使用した。

該PCR反応は、当業者に良く知られている方法 (Jones, M. A. 編, 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., San Diego CA) を実施した。得られたPCR産物をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリソソミン消化し、BamH I で消化し、次いでゲル精製して、下

#### PDIを過剰発達する組換え酵母株によるマダニ抗凝血ペ

#### ブチド(TAP)の公報

マダニ抗凝血ペプチド(TAP)は、血栓凝固因子Xaの強力な高選択性阻害物質である [Waxman, L. G., 1990, *Science*, 248, pp. 593-596]。TAPはマダニ *Oribatidios moulata* から単離された新規のセリンプロテアーゼ阻害物質である。TAPは、G型のンスティン族を含む60個のアミノ酸からなる (Waxmanら, 1990, 断山引用文献)。TAPは、ガラクトース糖基化~~を~~1-O-ブロモ-トクと、TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム組合した酵母~~酵母~~E. coliプレプロリードー配列と共に発現ベクター pKH4-TAPを用いて、酵母内で発現された (Neeser, M. G., 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 17746-17752)。このベクターは、プレプロリードーのアミノ酸79の位置に配置された BamH I クローニング部位の存在に起因して、少し改変された KpnI プレプロリードー配列を含む (Neeserら, 1990, 初出別月文献)。

TAPコードィング配列の並びなる「末端に準備末端を有し且つ翻訳終結コドンの3'側に付着 BamH I 末端を有する、0.12 kb pのプラント BamH I フラグメントを得た。

ベクター pKH4-3B (Hoffman, K. 及び Schulte, L. D., 1991, *Gene*, 101, pp. 103-111) は、Mfα1 プレプロリードーコードィング配列の3'末端に有反復 SphI 部位を含む。pKH4-3Bを SphI で消化し、T4-DNAポリメラーゼを処理して平滑末端化し、BglI で消化した。得られたプラント BglI II ベクターフラグメントをゲル精製し、前述の0.12 kb pのプラント-BamH I-TAPフラグメントと連結して、ベクター pKH4-3B/TAPを得た。

別個の逆算転換反応で、酵母株 J 1996, JRY189及びU9を、ベクター YEp24-GAL10p-uPDI 及び pKH4-3B/TAPもしくは pKH4-3B/TAPで同样形質転換した。両方のプラスミドを含む同様形質転換体を、ロイシン及びカラシルの両方を欠失した合成着地上で選択し、単離した单離体を同一培地上で再ストリ



## 特表平7-508881 (31)

配列の長さ : 一本鎖	配列の種類 : c-DNA	
トポロジー : 直鎖状	配列	
配列の種類 : c-DNA	TCCCCGGCGT CAAAG	
配列	16	
AACCTGGGGC CGGCGCTTCG AGGGCG	26	配列番号 : 1.0
配列番号 : 3	配列の長さ : 7.3 基塩対	
配列の長さ : 1.5 基塩対	配列の型 : 梱狀	
配列の型 : 梱狀	鎖の数 : 一本鎖	
鎖の数 : 一本鎖	トポロジー : 直鎖状	
トポロジー : 直鎖状	配列の種類 : c-DNA	
配列の種類 : c-DNA	配列	
配列	CATGGGAAA AGGAAATGGT GGGGGGGG GGTGGGGG TGGGGGGG GGGGGGGG 60	
AATTGGTTGA CGGGCG	73	
配列番号 : 9	配列番号 : 1.1	
配列の長さ : 1.5 基塩対	配列の長さ : 7.3 基塩対	
配列の型 : 梱狀	配列の型 : 梱狀	
鎖の数 : 一本鎖	鎖の数 : 一本鎖	
トポロジー : 直鎖状	トポロジー : 直鎖状	
配列の種類 : c-DNA	配列	
配列	TGGGGGGGT CGGGGGGG AGGGGGGG AGGGGGGG AGGGGGGG GGGGGGGG 60	
AATGGGGGGT GGGGGGGG	73	
配列番号 : 1.2	配列番号 : 1.2	
配列の長さ : 8.8 基塩対	配列の長さ : 9.1 基塩対	
配列の型 : 梱狀	配列の型 : 梱狀	
鎖の数 : 一本鎖	鎖の数 : 一本鎖	
トポロジー : 直鎖状	トポロジー : 直鎖状	
配列の種類 : c-DNA	配列の種類 : c-DNA	
配列	配列	
GAGGGGAGA AGGAAATGGT GTTTGGGGT GGGGGGGG TGGGGGGG GGGGGGGG 60	配列番号 : 1.4	
CGGGGGGGT GGGGGGGG	73	
配列番号 : 1.3	配列の長さ : 8.8 基塩対	
配列の長さ : 8.8 基塩対	配列の型 : 梱狀	
配列の型 : 梱狀	鎖の数 : 一本鎖	
トポロジー : 直鎖状	トポロジー : 直鎖状	
配列の種類 : c-DNA	配列の種類 : c-DNA	
配列	配列	
GAGGGGAGA AGGAAATGGT GTTTGGGGT GGGGGGGG TGGGGGGG GGGGGGGG 60	配列番号 : 1.5	
AAAGGGGGTG ACCGGGGGGT GGGGGGGG	73	

## 特許平7-508881 (82)

配列の長さ：9.5塩基対

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

ATTTCGATC TTTCAGCTTC ATTCGGCGACG CCGTCCGCTG CATGGCTTC  
CTGGCTGTCT GCTCTCGCTTC CTTCCTGCGA GTCGGCGAG CGGGCG30  
35

配列番号：1.6

配列の長さ：8.1塩基対

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

GATCCACAGA AGAAAGTGA GTTTCTGGT G

31

配列番号：1.7

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

TATAGGATCC TTATGATAGG CGTGCGATAA GCCT

32

配列番号：2.0

配列の長さ：2.0塩基対

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

TCAACGCTC TGTGCGTC

33

配列番号：2.1

配列の長さ：3.5塩基対

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：3.1塩基対

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

GCACGACGAG AACAGCTCAT TTTCCTTGT G

34

配列番号：1.8

配列の長さ：5.1塩基対

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

AGATGGATCC TGTCTTGTG TAAAGAGAGA GCGGTTTC GCGGGCGC E

35

配列番号：1.9

配列の長さ：3.4塩基対

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

CTCTGGATCC AACATCAAGCT TGCATGCCAG CGT

36

配列番号：2.0

配列の長さ：2.0塩基対

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

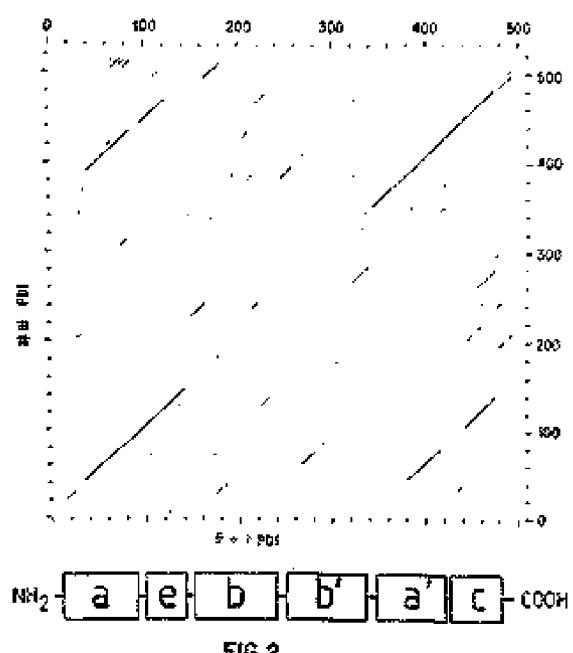
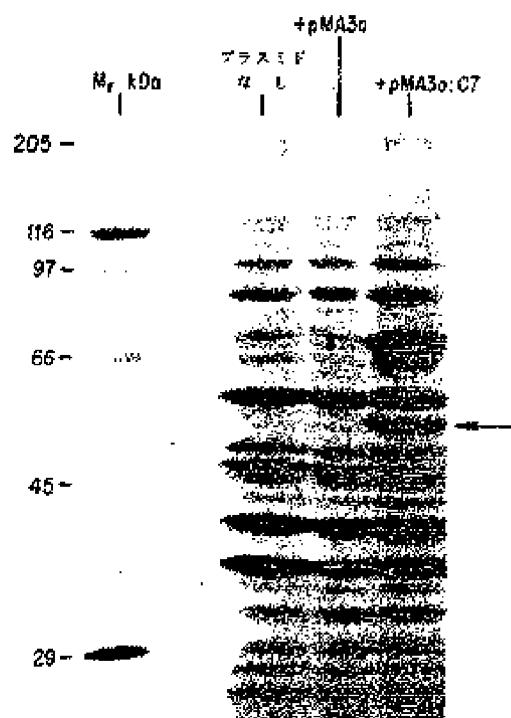


FIG. 2

FIG. 1

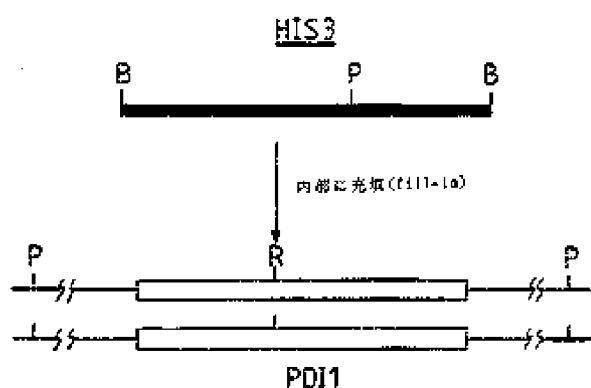


FIG. 3a



FIG. 3b

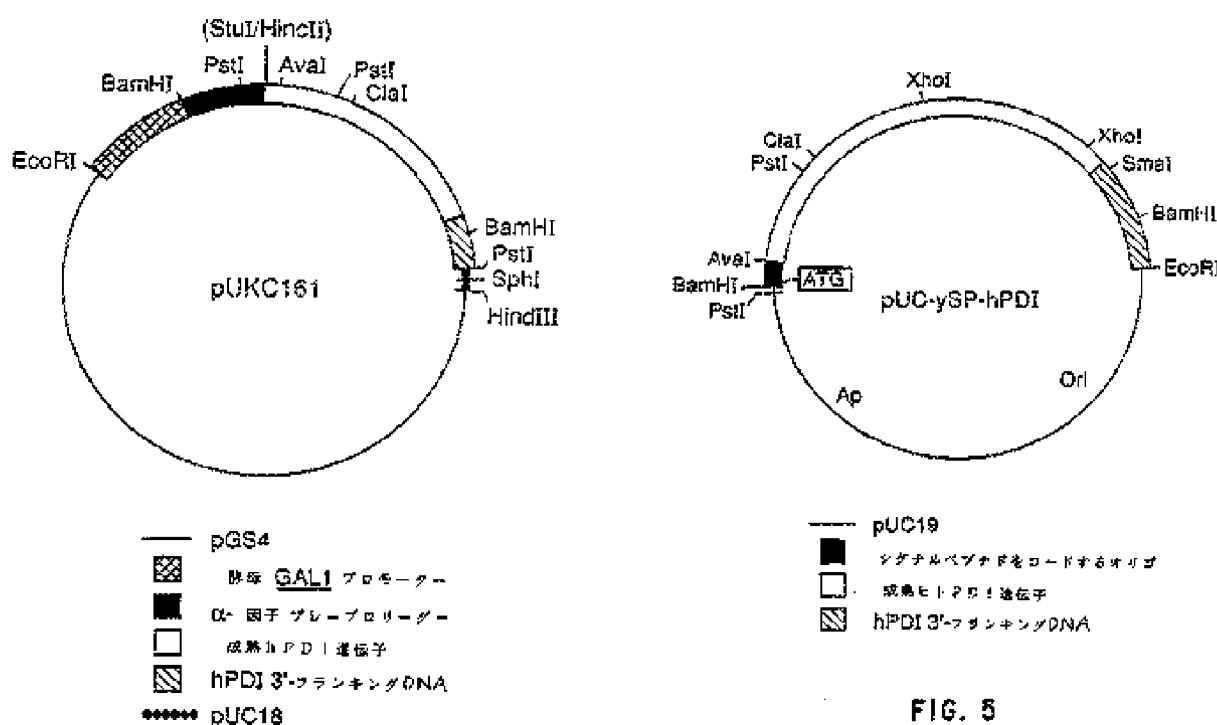


FIG. 4

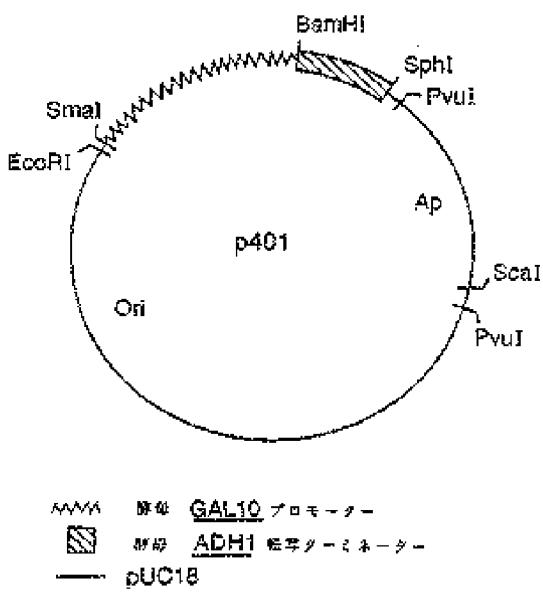


FIG. 6

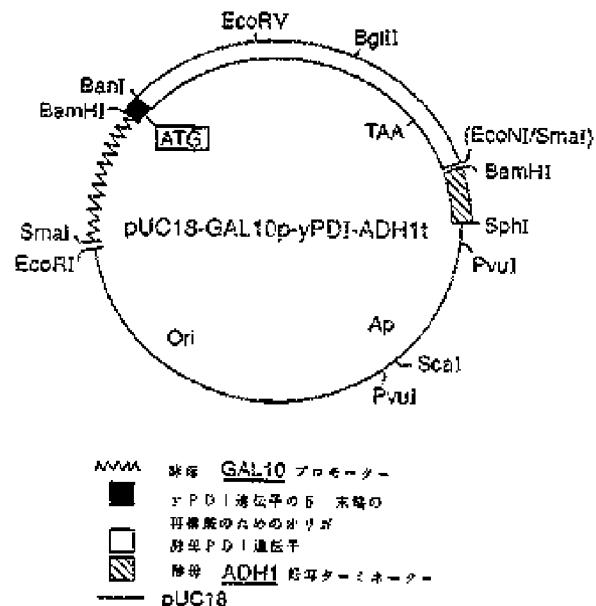
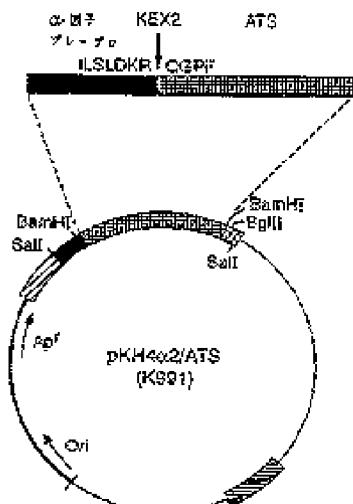
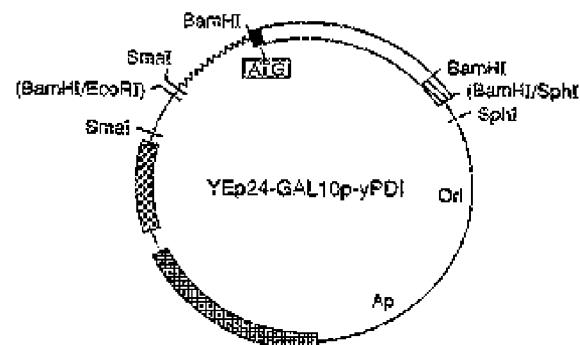


FIG. 7



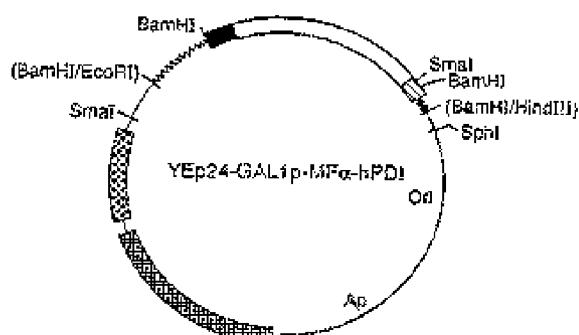
■  $\alpha$ -因子 GAL10 プロモーター  
■  $\alpha$ -因子 プレーブロリーザー<sup>+</sup>  
■ アンチストラシンコーティング配列  
■  $\alpha$ -因子 重合ターミネーター  
■ 2-ヒドロxyDNA  
■ レギュレーター  
■ LEU2-d 遺伝子  
— pBR322



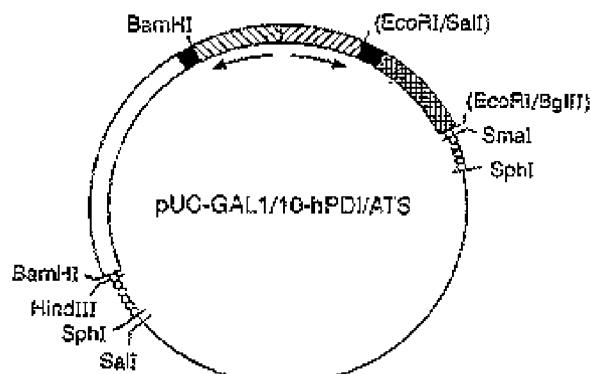
■ ■ ■  $\alpha$ -因子 GAL10 プロモーター  
■ ■ ■  $\alpha$ -因子 プレーブロリーザー<sup>+</sup>  
■ ■ ■  $\alpha$ -因子 ADH1 遺伝子 + ミキニマー  
— pBR322  
■ ■ ■ 2-ヒドロxyDNA  
■ ■ ■ URA3 遺伝子

FIG. 9

FIG. 8



■ ■ ■  $\alpha$ -因子 GAL1 プロモーター  
■ ■ ■  $\alpha$ -因子 プレーブロリーザー<sup>+</sup>  
■ ■ ■ hPDI 3'-カラシニア DNA  
■ ■ ■ pUC18  
— pBR322  
■ ■ ■ 2-ヒドロxyDNA  
■ ■ ■ URA3 遺伝子



■ ■ ■  $\alpha$ -因子 プレーブロリーザー<sup>+</sup>  
■ ■ ■ 成熟 hPDI 遺伝子  
■ ■ ■ アンチストラシンコーティング配列  
■ ■ ■  $\alpha$ -因子 ADH1 遺伝子 + ミキニマー  
■ ■ ■  $\alpha$ -因子 GAL10 分裂素プロモーター  
— pUC18

FIG. 10

FIG. 11

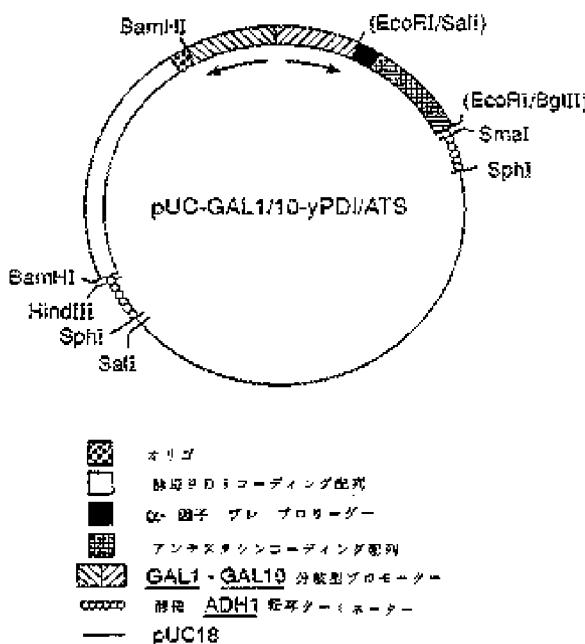


FIG. 12

特許平7-508881(36)		
出願請求書		
Invention Disclosure No. PTO/US/1992/000000		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
PCT/JP91/000144, 1991.09.25 According to International Patent Classification (IPC) or its National Equivalent B. RELATED ART SEARCH		
Prior art information and classification of known technology		
C. DOCUMENTS REFERRED TO IN RELEVANCE		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the subject matter	Reference sign No.
Y	Agricultural and Biological Chemistry, Vol. 52, No. 7, issued 1988, Okamura et al., "Effect of protein disulfide-isomerase on the refolding of bovine pro- $\beta$ -lactalbumin cloned and expressed in <i>Escherichia coli</i> ", pages 1715-1720. See entire article.	1-24
Y	Gene, Vol. 11(8), issued 1990, Eisinger et al., "Protein disulfide-isomerase is essential for viability in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", pages 61-68. See entire article.	1-24
D. Prior Art Cited in the World Patent Office C. Prior Art Cited in the World Patent Office		<input type="checkbox"/> Same patent family name.
The following prior art is cited in the World Patent Office:		<input type="checkbox"/> Different patent family name.
Y: International Patent Application The following documents are cited in the International Patent Application:		<input type="checkbox"/> International Patent Application No. PCT/JP91/000144, filed 25 September 1991, for which priority is claimed from Japanese Patent Application No. 1-192,093, filed 27 December 1990. The following documents are cited in the International Patent Application:
Z: National Patent Document The following documents are cited in the National Patent Document:		<input type="checkbox"/> National Patent Document No. 2-100,000, filed 27 December 1990, for which priority is claimed from Japanese Patent Application No. 1-192,093, filed 27 December 1990. The following documents are cited in the National Patent Document:
Y: International Publication The following documents are cited in the International Publication:		<input type="checkbox"/> International Publication No. WO/91/07321, filed 27 December 1990, for which priority is claimed from Japanese Patent Application No. 1-192,093, filed 27 December 1990. The following documents are cited in the International Publication:
Z: National Publication The following documents are cited in the National Publication:		<input type="checkbox"/> National Publication No. JP-A-2-100,000, filed 27 December 1990, for which priority is claimed from Japanese Patent Application No. 1-192,093, filed 27 December 1990. The following documents are cited in the National Publication:
Date of the initial examination of the application and name of the examining officer		Date of filing of the International application
1 August 1993 Name of the International Examining Officer International Bureau Address of the International Examining Officer Telephone No. 03-3561-5201 Telex No. 630-400-SCAF-E Fax No. 03-3561-5202		4.9.1993 PHILIP W. GARNER TELEPHONE NO. 03-3561-5201 FAX NO. 03-3561-5202

特許平7-508881(36)		
出願請求書		
Invention Disclosure No. PTO/US/1992/000000		
C. DOCUMENTS REFERRED TO IN RELEVANCE		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the subject matter	Reference sign No.
Y	Yeast, Vol. 2, issued 1990, Saitoh et al., "Characterization of the sequences of the yeast pUC33 gene localized on chromosome III. Heterology with the yeast dihydroxyacetone phosphate (DPA) gene product of other organisms", pages 128-139. See entire article.	1-24
Y	EP, A, 0 319 293 (Troyashima et al.) 07 December 1988. See examples 2 and 3 especially.	9
Y	The EMBO Journal, Vol. 6, No. 3, Nieminen et al., "Molecular cloning of the beta-eliminate of human poly(4-hydroxybutyrate). The tandem protein disulfide-isomerase are products of the same gene", pages 643-649. See the abstract in page 643 especially.	17, 18, 21, 22, 32
Y	Gene, Vol. 25, issued 1989, Han et al., "Cloning and expression of cDNA encoding annexin, a heat-stable protein having anti-coagulant and anti-inflammation properties", pages 47-57. See pages 47 and 55 especially.	14, 19
Y	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 26, issued 15 October 1990, Herzer et al., "Characterization of recombinant bovine anticoagulant peptide: A highly selective inhibitor of blood coagulation factor Xa", pages 17746-17752. See pages 17746 and 17751 especially.	15, 31

Foto PCT/JP91/000144 (Received by fax on 1992/09/01)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 庫内整理番号 F I  
 // (C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:865)  
 (C 1 2 N 1/16  
 C 1 2 R 1:865)  
 (C 1 2 N 9/90  
 C 1 2 R 1:865)

(61) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
 C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG  
 , CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,  
 TD, TG), AU, BB, BG, BR, CA, CZ,  
 FI, HU, JP, KR, KZ, LK, MG, MN, M  
 W, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA  
 , US

(72) 発明者 トウイート,マイケル・エフ  
 イギリス國,ケント・シー・ティー・4・  
 7・エヌ・ビー、チャータム・ハツチ、ナ  
 イティングイル・クロース・3

(72) 発明者 フリードマン,ロバート・ビー  
 イギリス國,ケント・シー・ティー・1・  
 1・エクス・アール、カンタベリー、セ  
 ント・オーガステインス・ロード・43

(72) 発明者 シュルツ,ローレン・ディー  
 アメリカ合衆國,ペンシルバニア・19438,  
 ハーリーズビル、オーク・ドライブ・421

(72) 発明者 エリス,ロナルド・ダブリュ  
 アメリカ合衆國,ペンシルバニア・19066,  
 メリオン,シカモア・アベニュー・206

(72) 発明者 マークス,ヘンリー・ゼット  
 アメリカ合衆國,ペンシルバニア・18095,  
 ウィンコート,ゾーンベリー・ロード・  
 1517

(72) 発明者 モンゴメリー,ドナ・エル  
 アメリカ合衆國,ペンシルバニア・18014,  
 テヤルフォント,ヒツヨリー・レーン・9